

**Funktionelle Charakterisierung eines  
LysM-Proteins von  
*Ustilago maydis***



**Dissertation**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)**

Dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Nancy Stolle**  
aus Zwickau

Marburg/Lahn, 2013



Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2009 bis April 2013 unter Betreuung von Frau Prof. Dr. Regine Kahmann in Marburg am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Abteilung Organismische Interaktionen durchgeführt.

Vom Fachbereich  
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation  
angenommen am: \_07.06.2013\_\_\_\_\_

Erstgutachter:        Frau Prof. Dr. Regine Kahmann  
Zweitgutachter:      Herr Prof. Dr. Michael Bölker

Tag der mündlichen Prüfung: \_\_\_\_13.06.2013\_\_\_\_\_

## Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Funktionelle Charakterisierung eines LysM-Proteins von *Ustilago maydis*“ selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

---

(Ort/Datum)

---

Name



*Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Mühen gesteckt hat, wieder wegzuwerfen*

Albert Einstein (1879-1955)

## Zusammenfassung

*Ustilago maydis*, der Erreger des Maisbeulenbrandes, ist für die Etablierung einer kompatiblen Interaktion mit seiner Wirtspflanze *Zea mays* auf die Sekretion zahlreicher Effektorproteine angewiesen. Zu solchen Effektoren gehören sekretierte LysM-Proteine phytopathogener Pilze. LysM-Proteine können essentielle Virulenzfaktoren sein, indem sie Chito-Oligosaccharide, welche durch pflanzliche Chitinasen aus der pilzlichen Zellwand freigesetzt wurden, abfangen und dadurch eine PAMP-vermittelte Resistenz der Pflanze unterdrücken. Im Genom von *U. maydis* wurde ein für ein LysM-Protein kodierendes Gen (*um11464*) identifiziert und näher untersucht. Die Deletion von *um11464* führte zu einem hypervirulenten Phänotyp in Pflanze. Eine detaillierte phänotypische Charakterisierung eines *um11464* Deletionsstammes ergab, dass dieser eine veränderte Morphologie in Flüssigkultur sowie eine erhöhte Sensitivität gegenüber Zellwandstressoren aufwies. Ferner wirkte sich die Deletion von *um11464* positiv auf die Filament- und Appressorienbildung aus. Die Penetrationseffizienz des Stammes SG200Δ*um11464* war hingegen im Vergleich zu SG200 unverändert.

Sekretionsanalysen zeigten, dass das Signalpeptid von Um11464 funktionell war. Um11464 konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt in Kulturüberständen nachgewiesen werden. Durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie und Immunmarkierungen wurde gezeigt, dass das Protein in der pilzlichen Zellwand lokalisiert. Es wurde eine C-terminale Verankerung über nicht-kovalente Verknüpfungen nachgewiesen. Eine Interaktion mit Chitin oder anderen pilzlichen Zellwandbestandteilen konnte durch Polysaccharid-Bindeversuche mit rekombinantem Um11464 nicht bestätigt werden.

Der positive Effekt der *um11464* Deletion auf die Differenzierungsprozesse vor der Penetration sowie die Virulenz von *U. maydis* könnte andeuten, dass Um11464 eine veränderte Pflanzenreaktion hervorruft. Um dies zu untersuchen, wurden vergleichende Mais-Transkriptomanalysen durchgeführt. Diese zeigten, dass eine Vielzahl abwehrinduzierter Pflanzengene, darunter einige Transkriptionsfaktoren, spezifisch nach Infektion mit der *um11464* Deletionsmutante herunterreguliert wurden, was eine aktive Unterdrückung der pflanzlichen Abwehr bedeuten könnte.

## Summary

*Ustilago maydis*, the causal agent of corn smut, depends on the secretion of various effector proteins in order to guarantee the establishment of a biotrophic interaction with its host plant *Zea mays*. Secreted LysM proteins in phytopathogenic fungi have been shown to play an essential role as virulence factors, since they are able to sequester chito-oligosaccharides that were released by plant chitinases, thereby preventing PAMP-triggered immunity. In that respect, one gene (*um11464*) encoding for a LysM-containing protein has been identified in the genome of *U. maydis*. In this study it was shown that the deletion of *um11464* resulted in a hypervirulent phenotype *in planta*. A detailed phenotypical characterization of an *um11464* deletion strain revealed that this strain shows a morphological phenotype in axenic culture as well as enhanced sensitivity towards cell wall stressors. Furthermore, the deletion of *um11464* was shown to positively influence filament and appressoria formation, although the penetration efficiency of SG200Δ*um11464* was not impaired.

Secretion assays revealed that the signal peptide of Um11464 is functionally active. However, Um11464 could never be detected in the culture supernatant.

Using confocal microscopy and immuno-labelling, Um11464 could be localized within the fungal cell wall. It could be shown that the protein binds non-covalently to the cell wall. However, polysaccharide binding assays revealed, that the attachment might not be achieved through binding to chitin or any other cell wall component.

The positive effect of the *um11464* deletion on differentiation and virulence could indicate that Um11464 might change plant defense responses. Transcriptional profiling of infected maize plants revealed that several plant genes involved in defense responses were indeed significantly induced in response to the *um11464* deletion strain. This suggests that plant defense responses are actively suppressed after *um11464* deletion.

## Abkürzungen und Fachbegriffe

aa	amino acid(s)	LysM	„lysine motif“
Abb.	Abbildung	mM / M	Millimolar / Molar
bp	Basenpaar(e)	min	Minute(n)
BSA	„bovine serum albumin“	Nat	Nourseothricin
bzw.	beziehungsweise	N-terminal	aminoterminal
cDNA	“complementary” DNA	OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
C-terminal	carboxyterminal	ORF	“open reading frame”
CR	Congo red	PAGE	Polyacrylamid-
CFW	Calcofluor white		Gelelektrophorese
Δ	Deletion	PAMP	“Pathogen-associated
DAPI	4', 6'-Diamino-2-Phenyl- indol	PCR	molecular pattern” “polymerase chain reaction”
d.h.	das heißt	PI	Propidium Iodid
DIC	“differential interference contrast”	ppi	Peptidylprolyl Isomerase
DMSO	Dimethylsulfoxid	PRR	“Pattern recognition receptor”
DNA	Desoxyribonukleinsäure	qPCR	quantitative „real-time“ PCR
dpi	“days post infection”	RNA	Ribonukleinsäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase	s	Sekunde(n)
GFP	“green fluorescent rotein”	SDS	sodium dodecyl sulfate
GPI	Glykosylphosphatidylinositol	SP	Signalpeptid
ggf.	gegebenenfalls	Tab.	Tabelle
h	Stunde(n)	Tris	Trishydroxymethylamino-
H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>	zweifach destilliertes Wasser		methan
HA	Hämagglutinin	U	Unit (Enzymaktivität)
hpi	„hours post infection“	u.a.	unter anderem
Hyg	Hygromycin	Upm	Umdrehungen pro Minute
HRP	„horse raddish peroxidase“	vgl.	vergleiche
kb	Kilobasenpaar(e)	Vol	Volumen
kDa	Kilodalton	WGA	„wheat germ agglutinin“
		z.B.	zum Beispiel

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>I</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>II</b>
<b>ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE .....</b>	<b>III</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>IV</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das pflanzliche Immunsystem .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 LysM Proteine .....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Die Funktion von LysM-Proteinen in Bakterien .....	3
1.2.2 Die Funktion von LysM-Proteinen in Pilzen .....	4
1.2.3 Die Rolle von LysM Proteinen im pflanzlichen Immunsystem .....	5
<b>1.3 Der Maisbeulenbrand <i>Ustilago maydis</i> .....</b>	<b>6</b>
1.3.1 Der Lebenszyklus von <i>U. maydis</i> .....	7
1.3.2 Die Rolle sekretierter Effektoren im <i>U. maydis</i> / <i>Z. mays</i> Pathosystem .....	9
<b>1.4 Fragestellung dieser Arbeit .....</b>	<b>10</b>
<b>2 ERGEBNISSE .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Domänenarchitektur des LysM-Proteins Um11464 .....</b>	<b>11</b>
<b>2.2 Regulation der <i>um11464</i> Expression während des Lebenszyklus von <i>U. maydis</i> .....</b>	<b>12</b>
<b>2.3 Die Rolle von Um11464 während der saprophytischen Wachstumsphase .....</b>	<b>13</b>
2.3.1 Um11464 beeinflusst die Zellmorphologie in axenischer Kultur .....	13
2.3.2 Um11464 wird für eine effiziente Septenbildung benötigt .....	14
2.3.3 Die Deletion von <i>um11464</i> erhöht die Sensitivität gegenüber Zellwandstressoren .....	15
<b>2.4 Die Rolle von Um11464 während der pathogenen Entwicklung von <i>U. maydis</i> .....</b>	<b>16</b>
2.4.1 Um11464 wirkt sich negativ auf die Virulenz aus .....	17
2.4.2 Die Überexpression von <i>um11464</i> reduziert die Tumorbildung in Pflanze .....	18
2.4.3 Der $\Delta$ <i>um11464</i> Virulenzphänotyp kann durch das <i>S. reilianum</i> Ortholog partiell komplementiert werden .....	19
2.4.4 Die Kolonisation von Pflanzengewebe wird durch Um11464 nicht beeinflusst .....	19
<b>2.5 Die Rolle von Um11464 bei der Bildung von Infektionsstrukturen .....</b>	<b>21</b>
2.5.1 Die <i>um11464</i> Mutante zeigt eine verstärkte Reaktion auf Hydroxy-Fettsäuren .....	21
2.5.2 Die <i>um11464</i> Mutante bildet verstärkt Appressorien auf der Blattoberfläche .....	22

2.5.3	Die Penetration der Pflanzenoberfläche wird durch Um11464 nicht beeinflusst .....	23
2.5.4	Die Oberflächenhydrophobizität von Hyphen wird durch Um11464 nicht beeinflusst.....	24
<b>2.6</b>	<b>Transkriptionelle Reaktion der Pflanze auf Infektion mit der <i>um11464</i> Mutante.....</b>	<b>25</b>
<b>2.7</b>	<b>Heterologe Expression von Um11464 .....</b>	<b>30</b>
2.7.1	Rekombinante Proteinsynthese in <i>E. coli</i> und Gewinnung polyklonaler Antikörper .....	30
2.7.2	Rekombinante Proteinsynthese in <i>N. benthamiana</i> .....	32
2.7.3	Heterolog exprimiertes Um11464 Protein interagiert nicht mit Polysacchariden .....	33
<b>2.8</b>	<b>Lokalisationsstudien zu Um11464.....</b>	<b>34</b>
2.8.1	Verifizierung der Funktionalität des N-terminalen Signalpeptids von Um11464 .....	34
2.8.2	Analyse der Um11464 Sekretion in Sporidien und b-abhängigen Filamenten .....	36
2.8.3	Untersuchungen zur Modifikation von Um11464 .....	38
2.8.4	Um11464 lokalisiert in der pilzlichen Zellwand.....	39
2.8.5	Um11464 ist mit der pilzlichen Zellwand assoziiert.....	45
2.8.6	Die nicht-kovalente Zellwandassoziation von Um11464 wird durch den C-Terminus bewerkstelligt .....	47
<b>3</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>51</b>
3.1	Das LysM-Protein Um11464 .....	51
3.2	Um11464 reguliert die Zellwandbeschaffenheit von <i>U. maydis</i> .....	52
3.3	Um11464 lokalisiert in der pilzlichen Zellwand .....	55
3.4	Um11464 wirkt sich negativ auf die pathogene Entwicklung von <i>U. maydis</i> aus .....	57
3.5	Um11464 bedingt eine veränderte Pflanzenreaktion .....	59
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>63</b>
4.1	Material und Bezugsquellen .....	63
4.1.1	Chemikalien .....	63
4.1.2	Puffer und Lösungen.....	63
4.1.3	Enzyme und Antikörper.....	63
4.1.4	Verwendete Kits.....	64
4.2	Zellkultivierung .....	64
4.2.1	Kultivierung von <i>E.coli</i> und <i>A. tumefaciens</i> .....	64
4.2.2	Kultivierung von <i>U. maydis</i> .....	64
4.2.3	Kultivierung von Hefen .....	67
4.2.4	Bestimmung der Zelldichte .....	69
4.3	Stämme, Oligonukleotide und Vektoren .....	69
4.3.1	Mais- ( <i>Zea mays</i> spec.) und Tabakvarietäten ( <i>Nicotiana</i> spec.) .....	69
4.3.2	<i>E. coli</i> Stämme .....	69

4.3.3	<i>A. tumefaciens</i> Stämme .....	70
4.3.4	Hefe-Stämme .....	70
4.3.5	<i>U. maydis</i> Stämme .....	71
4.3.6	Oligonukleotide.....	73
4.3.7	Plasmide.....	78
<b>4.4</b>	<b>Mikrobiologische und zellbiologische Methoden.....</b>	<b>83</b>
4.4.1	Transformationen .....	83
4.4.2	Filament- und Appressorieninduktion <i>in vitro</i> .....	87
4.4.3	Bestimmung der Oberflächenhydrophobizität .....	88
4.4.4	Pathogenitätstest von <i>U. maydis</i> .....	88
<b>4.5</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>89</b>
4.5.1	Isolierung von Nukleinsäuren .....	89
4.5.2	<i>In vitro</i> Modifikation von Nukleinsäuren .....	91
4.5.3	Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren .....	94
<b>4.6</b>	<b>Biochemische Methoden .....</b>	<b>97</b>
4.6.1	Gewinnung von Proteinextrakten.....	97
4.6.2	Proteinbestimmung nach Bradford .....	99
4.6.3	Proteinfällung.....	99
4.6.4	Auftrennung und Nachweis von Proteinen .....	99
4.6.5	Bestimmung post-translationaler Proteinmodifikationen .....	103
4.6.6	Heterologe Expression von Um11464 .....	104
4.6.7	Polysaccharid-Bindungs-Versuche .....	107
<b>4.7</b>	<b>Färbungen .....</b>	<b>107</b>
4.7.1	Färbung mit Calcofluor white.....	107
4.7.2	Färbung mit WGA/Alexafluor-488 und Propidium-Iodid .....	108
4.7.3	Biotinylierung von Zelloberflächen .....	109
4.7.4	In situ Immunofluoreszenz .....	109
<b>4.8</b>	<b>Mikroskopie und Bildverarbeitung .....</b>	<b>110</b>
<b>4.9</b>	<b>Transkriptom-Analysen mittels RNASeq .....</b>	<b>111</b>
4.9.1	RNA-Präparation .....	111
4.9.2	„Library“-Konstruktion.....	112
4.9.3	Datenanalyse.....	112
<b>4.10</b>	<b>Bioinformatische Analysen .....</b>	<b>113</b>
<b>5</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>114</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>126</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das pflanzliche Immunsystem

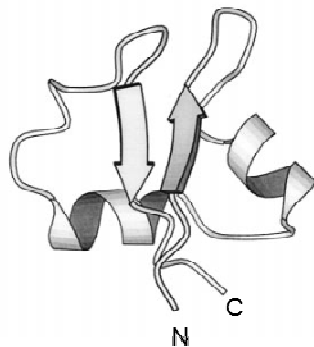
Pflanzen besitzen ein vielschichtiges Immunsystem, um pathogene Organismen zu erkennen und abzuwehren (Chisholm *et al.*, 2006; da Cunha *et al.*, 2006; de Wit, 2007). Dabei nehmen sie in einem ersten Schritt die durch das Pathogen freigesetzten, konservierten Moleküle, die sogenannten MAMPs oder PAMPs („*microbial/pathogen-associated molecular pattern*“) wie z.B. das bakterielle Flagellin oder Chitin der pilzlichen Zellwand, wahr. Dies geschieht über spezifische Membranrezeptoren (PRRs: „*pattern recognition receptor*“) und führt zu einer basalen Abwehr, die sich durch eine Erhöhung der intrazellulären Ionenflüsse, die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies, Callose-Depositionen und somit Stärkung der pflanzlichen Zellwand sowie durch Aktivierung intrazellulärer MAPK-Kaskaden äußert (Ausubel, 2005; Zipfel, 2008). Man spricht hierbei von einer PAMP-vermittelten Resistenz (PTI) der Pflanze (Chisholm *et al.*, 2006; Jones und Dangl, 2006). Diese kann durch sekretierte Virulenzfaktoren des Pathogens, auch Effektoren genannt, erfolgreich unterdrückt werden, was als „*effector-triggered susceptibility*“ (ETS) bezeichnet wird (Jones und Dangl, 2006). Die Pflanze ist jedoch häufig in der Lage, diese Effektorproteine zu erkennen und den Eindringling durch die Aktivierung eines sekundären Immunsystems abzuwehren (ETI: „*effector-triggered immunity*“). Hierbei spielen sogenannte Resistenzproteine (R-Proteine) eine zentrale Rolle, die neben der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies eine Reihe weiterer Abwehrmechanismen seitens der Wirtspflanze in Gang setzen. Im Falle eines biotrophen Eindringlings kommt es unter anderem zur Aktivierung eines Salicylat-abhängigen Signalweges, was zu einer verstärkten hypersensitiven Reaktion der Pflanze in Verbindung mit einem lokalen programmierten Zelltod führt (Bari und Jones, 2009; Glazebrook, 2005). Im Falle eines nekrotrophen Pathogens, der sich von totem Material ernährt, werden Jasmonat- und Ethylensignalwege induziert (Bari und Jones, 2009).

Der stetige Wettstreit um die besten Waffen bedingt, dass sowohl Effektoren als auch R-Proteine einem starken Selektionsdruck unterliegen (Koeck *et al.*, 2011). Die Erkennung von MAMPs und PAMPs durch die PRRs und die damit verbundene Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden bestimmt, ob die Pflanze den Organismus abwehrt oder einen mutualistischen Austausch eingeht (Müller und Felix, 2012).



## 1.2 LysM Proteine

Das Lysin-Motiv (LysM) ist ein Proteinmotiv, das eine Länge von 42 – 48 Aminosäuren umspannt und außer in Archaeen in allen Organismengruppen vorkommt (Buist *et al.*, 2008). LysMs sind durch ihre hohe Affinität zu Peptidoglukan, Chito-Oligosacchariden sowie anderen, strukturell ähnlichen Oligosacchariden gekennzeichnet (de Jonge und Thomma, 2009; Zhang *et al.*, 2009). Die Tertiärstruktur des Lysin-Motivs wurde bisher nur



**Abb. 1: Sekundärstruktur-Modellierung des Lysin-Motivs nach Kraulis, 1991.** Das Lysin-Motiv weist eine  $\alpha\beta\alpha$ -Topologie auf.

von zwei bakteriellen Proteinen bestimmt und ergab, dass es eine symmetrische  $\alpha\beta\alpha$  Topologie aufweist, wobei die beiden  $\alpha$ -Helices die zwei antiparallel laufenden  $\beta$ -Faltblätter auf einer Seite umschließen (Abb. 1) (Bateman und Bycroft, 2000; Bielnicki *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007). LysMs verschiedener Proteine sind im Allgemeinen über die ersten 16 sowie in etwas geringerem Maße über die letzten 10 Aminosäuren konserviert (Buist *et al.*, 2008; de Jonge und Thomma, 2009). Ein besonderes Merkmal ist hierbei die hohe Konservierung von vier Cysteinen, die zur

Ausbildung von Disulfidbrücken benötigt werden, um dem Protein die nötige Stabilität zu verleihen (Bateman und Bycroft, 2000). Auch zwei konservierte Glycine sowie ein hoch konserviertes Asparagin, welches als Bindestelle des Liganden postuliert wird, sind Teil des Lysin-Motivs (Buist *et al.*, 2008). Die Anzahl der Lysin-Motive in einem LysM-Protein variiert von einem bis zwölf Wiederholungen. Dabei können Proteine ausschließlich LysMs enthalten oder mit anderen, funktionellen Proteinmotiven kombiniert sein (de Jonge und Thomma, 2009; Zhang *et al.*, 2009). Die einfachste und am häufigsten auftretende Protein-Domänenstruktur, bestehend aus nur einem LysM, kommt sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten vor. Andere Domänenarchitekturen hingegen sind spezifisch nur in einer Organismengruppe zu finden. Proteine, bei denen ein oder mehrere Lysin-Motive mit einer Amidase-Domäne kombiniert sind, kommen beispielsweise nur in Bakterien vor, während Proteine mit LysMs und einer enzymatisch aktiven Glycolhydro18-Domäne nur in Pilzen vertreten sind (Zhang *et al.*, 2009). Proteine, deren LysMs mit einer Kinase-Domäne gekoppelt sind, findet man wiederum nur im Pflanzenreich vor (Zhang *et al.*, 2009). Man geht davon aus, dass die für LysM-Proteine kodierenden Gene in den einzelnen Organismengruppen unterschiedlichen Evolutionseinflüssen unterlagen, was

zu spezialisierten Domänenarchitekturen sowie einer funktionellen Anpassung der jeweiligen Proteine geführt haben könnte (Zhang *et al.*, 2009).

### 1.2.1 Die Funktion von LysM-Proteinen in Bakterien

Das Lysin-Motiv wurde erstmals als Proteindomäne im Lysozym des Bakteriophagen  $\phi 29$  identifiziert, wo es der hydrolytischen Spaltung glykosidischer Bindungen zwischen N-Acetylmuraminsäure und N-Acetyl-D-Glukosamin dient (Garvey *et al.*, 1986). Die Mehrheit der bislang identifizierten Lysin-Motive konnten bakteriellen Proteinen zugeordnet werden ([http://smart.embl-heidelberg.de/smart/do\\_annotation](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/do_annotation)) und sind als Peptidoglykan-bindende Domänen mit zum Teil Zellwand-degradierender Eigenschaft beschrieben (Buist *et al.*, 2008). Dabei binden LysM-Proteine verschiedene Formen des Peptidoglykans und die Kombination mit weiteren funktionellen Proteindomänen ist auch hier keine Seltenheit (Steen *et al.*, 2003). Die Muramidase AcmA von *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 z.B. besteht aus einer aktiven hydrolytischen Domäne sowie einem C-terminalen Proteinbereich, der drei konservierte Lysin-Motive trägt (Steen *et al.*, 2005). Während die Lysin-Motive der Anbindung an die Zellwand dienen, wird die hydrolytisch aktive Domäne für die autolytische Spaltung während der stationären Wachstumsphase benötigt (Buist *et al.*, 1997; Buist *et al.*, 1995). Ähnlich verhält es sich für die Endopeptidasen Cse in *Streptococcus thermophilus* und DipM in *Caulobacter crescentus*. Eine erfolgreiche Zellteilung wird in beiden Organismen durch die Kombination aus Zellwand-bindenden Lysin-Motiven und einer hydrolytisch wirksamen CHAP-Domäne im Falle von Cse (Borges *et al.*, 2006; Layec *et al.*, 2009) bzw. einer Lysostaphin-ähnlichen Peptidasedomäne im Falle von DipM (Möll *et al.*, 2010) gewährleistet. Einige der beschriebenen LysM-Proteine in Bakterien werden zudem als Virulenzfaktoren eingruppiert. Hierzu zählt unter anderem die N-Acetylmuramyl-L-Alanine-Amidase Sle1 von *Staphylococcus aureus*. Dieses Protein beherbergt drei N-terminale Lysin-Motive, die aufgrund ihrer Zellwand-bindenden Eigenschaft entscheidend zur Zellteilung beitragen. Mutationen in *sle1* beeinträchtigen die Zellteilung und führen zu einer Aggregatbildung, die sich negativ auf den Infektionsverlauf im Mausmodell auswirkt (Kajimura *et al.*, 2005). Die  $\alpha\beta\alpha$  Tertiärstruktur sowie der Interaktionsmechanismus eines Lysin-Motivs mit seinem Liganden wurde erstmals am Beispiel der Murein-Transglykosylase D (MltD) in *Escherichia coli* mittels Kernspinresonanz aufgezeigt (Bateman und Bycroft, 2000). Dabei wird vermutet, dass ein konserviertes Asparagin, welches in der Schleife zwischen dem

ersten  $\beta$ -Faltblatt und der ersten  $\alpha$ -Helix der Domäne positioniert ist, die Ligandenbindung übernimmt.

### 1.2.2 Die Funktion von LysM-Proteinen in Pilzen

Neben ihrem Vorkommen in bakteriellen Proteinen werden mehr und mehr LysM-Proteine auch im Reich der Pilze beschrieben. Das erste identifizierte, pilzliche LysM-Protein war eine sekretierte Chitinase der Hefe *Kluyveromyces lactis*, die Untereinheiten eines Killertoxins enthält und dadurch das Wachstum sensibler Hefen inhibiert (Stark und Boyd, 1986). Anders als in Bakterien bindet das Lysin-Motiv in Pilzen vorwiegend Chito-Oligosaccharide (Chitin) und dessen Derivate. Da die meisten LysM-Proteine in Pilzen ins Medium sekretiert werden, fungieren sie vorwiegend als Virulenzfaktoren mit der Eigenschaft, die Abwehrsysteme ihres Wirtes zu unterdrücken bzw. diesen zu schädigen (Bolton *et al.*, 2008; Buist *et al.*, 2008). Der mycoparasitäre Pilz *Trichoderma atroviride* beispielsweise sekretiert Chitinasen, welche neben einer Chitin-Bindedomäne auch Lysin-Motive enthalten können (Gruber *et al.*, 2011). Das Vorhandensein von LysM-enthaltenden Proteinen in mycoparasitären Pilzen steht im Einklang mit ihrem Lebensstil, denn die Anbindung dieser Proteine an das Chitin der Zellwand kann sowohl dem Schutz der eigenen Zellwand als auch dem erleichterten Abbau komplexer Chitinverbindungen in den Zellwänden anderer Pilze dienen (Gruber *et al.*, 2011). Auch *Cladosporium fulvum*, der Erreger der Braunfleckenkrankheit in Tomate, weist ein LysM-Protein in seinem Sekretom auf. Dieser LysM-Effektor, Ecp6, bindet Chitin-Monomere, die durch pflanzliche Chitinasen aus der pilzlichen Zellwand freigesetzt wurden und verhindert damit die Elizitierung einer Chitin-vermittelten Resistenz seiner Wirtspflanze Tomate (Bolton *et al.*, 2008; de Jonge *et al.*, 2010). Dabei wurde gezeigt, dass Ecp6 ausschließlich Chitin bindet (de Jonge *et al.*, 2010). Zwei Ecp6-ähnliche Proteine aus *Mycosphaerella graminicola*, Mg1LysM und Mg3LysM, binden das Chitin der pilzlichen Zellwand und üben hierüber eine Schutzfunktion der Pilzhyphe gegenüber Chitinasen aus. Zusätzlich ist Mg3LysM in der Lage, lösliche Chitin-Fragmente zu binden und somit die pflanzliche Immunabwehr erfolgreich zu unterdrücken (Marshall *et al.*, 2011). Ähnlich verhält es sich mit dem sekretierten Effektorprotein Slp1 in *Magnaporthe oryzae*. Dieser LysM-Effektor enthält zwei Lysin-Motive und ist in der Lage, aus der pilzlichen Zellwand freigesetzte Chitin-Monomere zu binden. Dabei zeigt Slp1 eine wesentlich höhere Affinität zu Chitin-Oligosacchariden als der LysM-Plasmamembran-Rezeptor CEBiP und vermag dadurch

eine Chitin-vermittelte Resistenz seiner Wirtspflanze *Oryza sativa* zu unterdrücken (Mentlak *et al.*, 2012). Die Kombination eines Lysin-Motivs mit weiteren Proteindomänen ist in pilzlichen LysM-Proteinen relativ selten (de Jonge und Thomma, 2009). Generell gilt jedoch, dass sie durch ihre hohe Affinität zu Chito-Oligosacchariden entscheidend Einfluss auf den Infektionsverlauf und die damit verbundene Virulenz des Pathogens nehmen können.

### 1.2.3 Die Rolle von LysM Proteinen im pflanzlichen Immunsystem

In Pflanzen übernehmen LysM-Proteine eine wichtige Funktion im Zuge der Abwehr gegenüber phytopathogener Organismen. Die Chitinase A in *Pteris ryukyuensis* beispielsweise besitzt neben einer katalytisch aktiven Domäne im C-Terminus zwei N-terminale Lysin-Motive, welche die Anbindung an das Chitin pilzlicher Zellwände entscheidend beeinflussen und somit wesentlich zur Aktivität des Proteins beitragen (Ohnuma *et al.*, 2008; Onaga und Taira, 2008). Das Lysin-Motiv in pflanzlichen Proteinen ist jedoch häufig auch mit einer Kinase-Domäne gekoppelt. Diese Kombination, auch LysM-Rezeptor-Kinase oder LYK-Protein genannt, findet man ausschließlich im Reich der Pflanzen vor (Bateman und Bycroft, 2000; Zhang *et al.*, 2009). LYK-Proteinen kommt eine essentielle Rolle in der Perzeption von PAMPs sowie der Signalweiterleitung zu (Zhang *et al.*, 2007). CERK1 (Chitin-Elicitor Rezeptor-Kinase), eine Rezeptorkinase mit drei extrazellulären LysM-Domänen in *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa*, bindet neben Chitin auch das Chitin-Derivat Chitosan und führt nach Aktivierung intrazellulärer Signal-Kaskaden zu einer PAMP-vermittelten Resistenz (Iizasa *et al.*, 2010; Miya *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2008). Dabei werden alle drei LysM-Domänen für die Ligandenbindung benötigt, wobei die Affinität stark vom Polymerisationsgrad des Chito-Oligomers abhängt (Petutschnig *et al.*, 2010). Das Plasmamembran-verankerte Glykoprotein CEBiP (Chitin-Elicitor-binding Protein) in der Reispflanze besitzt im Vergleich zu CERK1 keine intrazelluläre Kinase-Domäne (Kaku *et al.*, 2006; Shimizu *et al.*, 2010). Man geht davon aus, dass CEBiP und CERK1 einen Rezeptor-Komplex durch die Interaktion ihrer LysM-tragenden extrazellulären Domänen bilden und gemeinsam für eine durch Chitin induzierte basale Immunabwehr sorgen (Shimizu *et al.*, 2010). CEBiP-ähnliche Proteine vergleichbarer Funktion finden sich unter anderem in Gerste (*H. vulgare*) und Schneckenklee (*M. truncatula*) (Fliegmann *et al.*, 2011; Tanaka *et al.*, 2010).

LysM-Proteine in Pflanzen sorgen jedoch nicht nur für die Erkennung und Abwehr pilzlicher Eindringlinge. In Leguminosen beispielsweise verhelfen sie der Etablierung einer mutualistischen Beziehung zu Knöllchenbakterien durch die Perzeption sogenannter Nod-Faktoren. Diese bestehen in ihrer Grundstruktur aus  $\beta$ -1,4-verknüpften N-Acetyl-D-Glukosaminen (Lerouge *et al.*, 1990) und ähneln damit stark dem Grundgerüst des Chitins. Die Perzeption solcher Nod-Faktoren führt zu einer Krümmung des Wurzelhaares, worüber die Knöllchenbakterien (Rhizobien) in die Wurzel eindringen können. Außerdem bewirken sie eine vermehrte Zellteilung im Wurzel-Cortex, was zur Bildung knötchenartiger Wurzelverdickungen, den sogenannten „Wurzelknöllchen“ führt. In diesen fixieren die Rhizobien molekularen Stickstoff ( $N_2$ ) und reduzieren ihn zu Ammoniak ( $NH_3$ ), welcher von der Pflanze aufgenommen werden kann. Im Gegenzug erhalten die Rhizobien organische Kohlenstoffverbindungen und Wasser. Beispiele für solche Nod-Faktor-Rezeptoren sind die LysM-Serine/Threonin-Rezeptor-Kinasen NFR1 und NFR5 in *Lotus japonicus* (Madsen *et al.*, 2003; Radutoiu *et al.*, 2003), NFP in *Medicago truncatula* (Mulder *et al.*, 2006) oder SYM2 in *Pisum sativum* (Limpens *et al.*, 2003).

### 1.3 Der Maisbeulenbrand *Ustilago maydis*

*Ustilago maydis*, ein dimorpher Basidiomycet, gehört zur Abteilung der Brandpilze und ist der Erreger des Maisbeulenbrandes. Diese Pflanzenkrankheit äußert sich durch das verbrannte Aussehen der massiv mit schwarzen Teliosporen gefüllten Tumore, welche an



**Abb. 2: Symptome des Maisbeulenbrandes.** Die schwarzen Tumore verleihen der Pflanze ein verbranntes Aussehen. Foto aufgenommen und zur Verfügung gestellt von S. Krombach.

allen oberirdischen Pflanzenteilen auftreten können (Abb. 2). Zum Wirtsspektrum von *U. maydis* gehören Mais (*Zea mays*) und Teosinte, die Wildform von Mais. Da Mais nicht nur als Futterpflanze, sondern auch zur Energieversorgung und als Nahrungsmittel vor allem in Lateinamerika und Afrika angebaut wird, sind die durch *U. maydis* erzeugten Schäden von ökonomischer Schwere (Christensen, 1963). Allerdings werden die durch *U. maydis* erzeugten Tumore auch als Delikatesse, vorwiegend in der mexikanischen Küche, gehandelt (Juarez-Montiel

*et al.*, 2011; Ruiz-Herrera und Martinez-Espinoza, 1998).

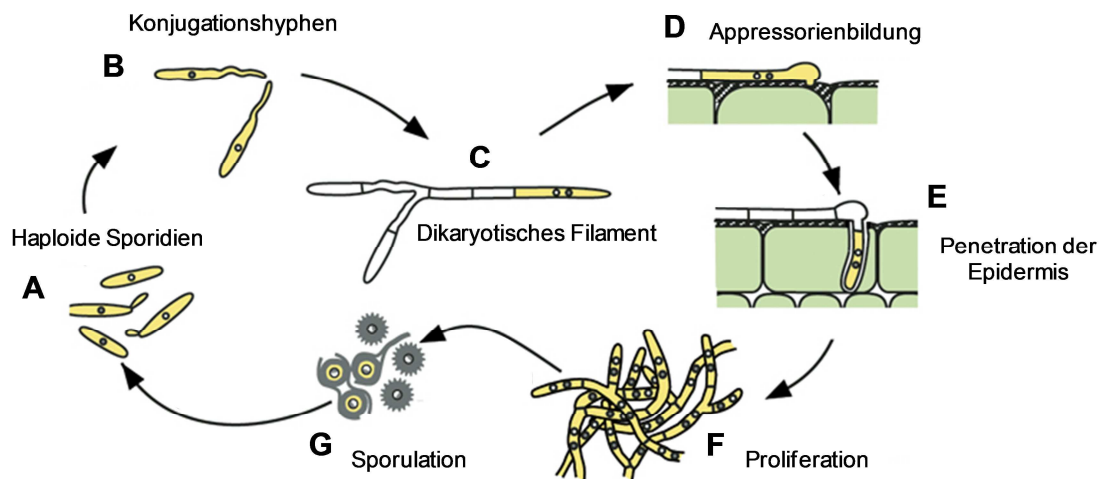
*U. maydis* eignet sich aufgrund seiner Kultivierbarkeit in axenischer Kultur, der genetischen Zugänglichkeit sowie seines relativ kurzen Lebenszykluses von zwei bis drei Wochen hervorragend als Modellorganismus für Studien an biotrophen, phytopathogenen Pilzen. Zudem wurde das Genom komplett entschlüsselt (Kämper *et al.*, 2006), was nicht nur bioinformatische Analysen erleichtert, sondern auch vergleichende Analysen mit den neuerdings veröffentlichten Genomsequenzen der nahe verwandten Brandpilze *U. hordei* (MUHDB; <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/MUHDB/>) und *S. reilianum* (MSRDB; <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/sporisorium/>) ermöglicht.

### 1.3.1 Der Lebenszyklus von *U. maydis*

Als fakultativ biotropher Pilz ist die pathogene Entwicklung von *U. maydis* eng an die Entwicklung seiner Wirtspflanze Mais gekoppelt. Dabei beginnt sein Lebenszyklus mit haploiden, saprophytisch wachsenden Sporidien, die sich asexuell durch hefeartige Knospung vermehren (Abb. 3A). Erst die Fusion zweier Sporidien unterschiedlichen Paarungstyploci leitet die biotrophe und damit pathogene Entwicklung von *U. maydis* ein (Rowell, 1955; Rowell und DeVay, 1954). Dabei codiert der bi-allelische *a*-Lokus für ein Pheromon/Pheromon-Rezeptor-System, was die Erkennung und Zellfusion ermöglicht (Bölker *et al.*, 1992). Die Perzeption von Pheromon führt zur Bildung unseptierter Konjugationshyphen (Abb. 3B), die entlang des Pheromongradienten aufeinander zuwachsen und an den Spitzen miteinander fusionieren (Snetselaar und Mims, 1992). Das so entstandene dikaryotische Filament (Abb. 3C) stellt die infektiöse Form von *U. maydis* dar und bedarf eines zweiten, multi-allelischen *b*-Paarungstyplokus (Holliday, 1961; Rowell, 1955). Dieser Locus codiert für zwei Transkriptionsfaktoren, *bE* und *bW*, die erst dann einen aktiven *b*-Protein-Komplex bilden, wenn sie von unterschiedlichen Allelen stammen (Banuett und Herskowitz, 1996; Gillissen *et al.*, 1992; Yee und Kronstad, 1993). Das dikaryotische Filament zeigt Spitzenwachstum, wobei distale Hyphensegmente durch Septierungen von der Cytoplasma-gefüllten Spitzenzelle abgetrennt werden (Christensen, 1963; Freitag *et al.*, 2011).

Der Kontakt zur pflanzlichen Oberfläche spielt eine essentielle Rolle für die Differenzierungsprozesse in *U. maydis* (Apoga *et al.*, 2004). Die Bildung septierter Filamente und Appressorien wird durch physikalische Stimuli wie Oberflächenbeschaffenheit und Hydrophobizität induziert und kann durch chemische Signale wie epicuticuläre Waxe und Cutinmonomere positiv stimuliert werden (Abb. 3D)

(Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009). Jene Vorgänge können auch *in vitro* nachvollzogen werden. Die Zugabe von Fettsäuren (16-Hydroxy-Palmitinsäure, HPS) führt in axenischer Kultur zur Bildung Cytoplasma-gefüllter Filamente ohne Appressorien. Hydrophobe Oberflächen wie Parafilm induzieren ebenfalls die Bildung septierter Filamente, die zudem bereits Appressorien ausbilden. Die Effizienz der Appressorienbildung kann auf Parafilm durch einen Fettsäurestimulus zusätzlich erhöht werden. Die Appressorien in *U. maydis* zeichnen sich durch eine leichte Verdickung der Hyphenspitze aus und die Appressorien sind nicht, wie bei vielen anderen, phytopathogenen Pilzen, melanisiert (Bell und Wheeler, 1986; Tucker und Talbot, 2001). Somit erfolgt die Penetration der Pflanzenoberfläche nicht über mechanischen Druck, sondern bedarf der Sekretion lytischer Enzyme (Heiler *et al.*, 1993; Kämper *et al.*, 2006). Die penetrierende Hyphe wird anschließend von der Cytoplasmamembran der Wirtszelle umgeben (Abb. 3E). Es entsteht eine sogenannte biotrophe Interaktionszone, die der „Kommunikation“ zwischen Pilz und Pflanze sowie der Nährstoffversorgung von *U. maydis* dient. Durch die Sekretion von Effektoren in diesen apoplastischen Raum gelingt es *U. maydis*, die pflanzliche, durch PAMPs ausgelöste Immunantwort zu unterdrücken und eine biotrophe Interaktion herzustellen (Doehlemann *et al.*, 2008).



**Abb. 3: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *U. maydis*.** Der Lebenszyklus von *U. maydis* lässt sich in ein saprophytisches (A-C) und ein biotrophes Stadium (D-F) unterteilen. Nähere Angaben zu den einzelnen Phasen finden sich im Text. Modifiziert nach Kämper *et al.* (2006).

Nach erfolgreicher Penetration wächst *U. maydis* zunächst intrazellulär in Epidermiszellen. Obwohl die Hyphen später bis in tiefere Zellschichten des Mesophylls vordringen und massiv proliferieren (Abb. 3F), bleibt das Pflanzengewebe intakt und eine Immunantwort

der Pflanze kann vorerst nicht beobachtet werden. Etwa 4 Tage nach Infektion setzt unter Gewächshausbedingungen eine Tumorentwicklung ein, welche mit einer durch *U. maydis* induzierten, übermäßigen Zellteilung und Vergrößerung der Pflanzenzellen einhergeht (Callow, 1975). Im Tumorgewebe selbst findet die Karyogamie statt. Die Hyphen fragmentieren, runden sich ab und reifen zu diploiden Teliosporen, welche in eine gallertige Matrix eingebettet sind (Banuett und Herskowitz, 1996) (Abb. 3G). Nach Freisetzung der Sporen werden diese durch Wind, Regen oder Tiere verbreitet und keimen unter geeigneten Bedingungen zu einer Probasidie aus, in der die Meiose stattfindet und von welcher sich haploide Zellen abschnüren (Christensen, 1963). Durch die Bildung haploider Sporidien wird der Lebenszyklus geschlossen.

### 1.3.2 Die Rolle sekretierter Effektoren im *U. maydis* / *Z. mays* Pathosystem

*U. maydis* ist aufgrund seiner biotrophen Lebensweise darauf angewiesen, dass seine Wirtspflanze *Z. mays* überlebt und ihn stetig mit Nährstoffen versorgt. Schädigungen des pflanzlichen Gewebes, was eine direkte Immunantwort der Pflanze zur Folge hätte, müssen somit vermieden werden. Letztlich garantiert die Unterdrückung der Immunreaktion und ein erfolgreiches Umprogrammieren des pflanzlichen Metabolismus die Etablierung einer kompatiblen biotrophen Interaktion. *U. maydis* steht dafür ein großes Arsenal verschiedener, sekretierter Effektoren zu Verfügung. Diese können ihre Wirkung entweder in der apoplastischen Interaktionszone oder aber nach erfolgter Translokation im Cytoplasma der Pflanzenzelle entfalten (Djamei *et al.*, 2011; Doehlemann *et al.*, 2009; Hemetsberger *et al.*, 2012).

Das Genom von *U. maydis* ist im Vergleich zu anderen, phytopathogenen Pilzen mit 20,5 Mb recht klein (Kämper *et al.*, 2006). Es umfasst in etwa 6900 Protein-kodierende Gene. Davon werden 426 Proteine potentiell sekretiert, jedoch ist die Funktion der meisten bisher unbekannt, da sie keine konservierten Domänen bekannter Funktion enthalten. Ein Großteil der für diese Proteine kodierenden Gene liegt in Clustern im Genom vor und die Genexpression wird spezifisch während der biotrophen Phase induziert (Kämper *et al.*, 2006). Deletionsanalysen ergaben, dass 5 der 12 Gencluster eine Veränderung der Virulenz bewirkten, wobei neben einem völligen Pathogenitätsverlust bis hin zu einem hypervirulenten Phänotyp alle Symptome beobachtet werden konnten (Kämper *et al.*, 2006).



Für einige *U. maydis* Effektoren konnte bereits gezeigt werden, dass sie die Pflanzenabwehr direkt modulieren. Der apoplastische Effektor Pep1 z.B. ist essentiell für die Etablierung einer biotrophen Interaktion. *pep1* Deletionsmutanten sind zwar fähig, Appressorien auszubilden und zu penetrieren, allerdings rufen sie eine starke Pflanzenabwehrreaktion hervor (Doehleemann *et al.*, 2009). Spätere Studien belegten, dass Pep1 direkt Einfluss auf die Virulenz von *U. maydis* nimmt, indem dieser Effektor pflanzliche Peroxidasen inhibiert und somit die frühe Immunantwort der Pflanze unterdrückt (Hemetsberger *et al.*, 2012). Ein weiterer Effektor mit apoplastischem Wirkungsort ist Pit2. Zusammen mit dem Transmembranprotein Pit1 ist der sekretierte Effektor Pit2 Teil eines Genclusters und wird für eine erfolgreiche Unterdrückung der Pflanzenabwehr benötigt (Doehleemann *et al.*, 2011; Mueller *et al.*, 2013). Die sekretierte Chorismatmutase CmuI wird durch einen bisher unbekannten Mechanismus in die Pflanzenzelle aufgenommen und bewirkt dort eine Umprogrammierung des Pflanzenmetabolismus zugunsten von *U. maydis* (Djamei *et al.*, 2011). Durch das Zusammenspiel mit der cytosolisch wirksamen Mais-Chorismatmutase ZmCmu2 verringert der *U. maydis* Effektor CmuI die Chorismat-Substratkonzentration in Plastiden und unterdrückt somit die Synthese von Salicylsäure in diesem Kompartiment. Um das manipulative Ausmaß des *U. maydis* Sekretoms im Ganzen zu verstehen, gilt es, den Wirkungsort und die Funktion aller sekretierten Effektoren zu untersuchen.

## 1.4 Fragestellung dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollte der Virulenzphänotyp von *um11464* Mutanten untersucht und durch Komplementations- und Überexpressionsanalysen ergänzt werden. Eine detaillierte phänotypische Charakterisierung der *um11464* Deletionsmutante sowie Lokalisationsstudien sollten Aufschluss über die Funktion dieses Effektors während der Entwicklung von *U. maydis* geben. Dies sollte durch die heterologe Expression von Um11464 und weiterführende biochemische Analysen vervollständigt werden. Eine veränderte Pflanzenreaktion auf die *um11464* Mutante sollte durch vergleichende Mais-Transkriptionsanalysen näher untersucht werden.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Domänenarchitektur des LysM-Proteins Um11464

Das Gen *um11464* befindet sich auf Chromosom 5 im Genom von *U. maydis* und codiert für ein 316 Aminosäuren langes Protein (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago/>). Dieses besitzt ein putatives N-terminales Signalpeptid (SignalP; <http://cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) sowie zwei LysM-Domänen (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), welche eine Aminosäureidentität von 22% teilen. Neben drei putative N-Glycosylierungsstellen (Abb. 4) (NetOGlyc; <http://cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) sowie einer vorhergesagten  $\omega$ -site an der Aminosäureposition 291 im C-terminalen Bereich (Abb. 4) (BIG-PI Fungal Predictor; [http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html)), welche eine Glycosylphosphatidylinositol (GPI)- Verankerung des Um11464 Proteins in der Membran zur Folge haben könnte, konnten keine weiteren funktionellen Domänen durch Verwendung bioinformatischer Vorhersageprogramme identifiziert werden.

```

Um11464      1 mralsvllsavtllpiltraaafhsntactrhytvqpgdtedkigqktltstyqilafnlldagadcytleigsrklcrgyngdcqfvhqcseqdtcesi
Uh-03469    1 mrissallsa-allplavraafhsndtactrhytvqaddtdckigqktltstyqilafnlldagadcytleigsrklcrgyngdcqfvhqcseqdtcesi
Ssci_00044   1 mrvfsallsaallpiltraaafhsndtactrhytvqgddtdckigqktltstyqilafnlldagadcytleigsklclrgyngdcqfvhqcseqdtcesi
Sr_13312     1 mrvfsallsttllpilaraafhsndtactrhytvqsgdtdckigqktltstyqilafnlldagadcytleigsklclrgyngdcqfvhqcseqdtcesi

Um11464     101 anaysittelqsnpsldcdvvygglmclvsagsirppadssinatdvkaarekarqmw1-----tkqand-----hfsaphstkatkqian
Uh-03469    100 anayritterlqsnpsldcntvyeglmclvsagsirppadgsinatdvkareqarqmw1mgerikmpdadnkkegdkkhhahttskqqtshkkqhkh
Ssci_00044   101 anaygittqrlqsnpsldcdvvygglmclvsagsirppadssinatdvkaareqarqmw1-----akqpa-----qvpqp--asrhkshk
Sr_13312     101 anaygittqrlqsnpsldcnivyggglmclvsagsirppadssinatdvkaareqarqmw1-----akqppkd-----sqpasahktk----

Um11464     185 dhfsaphstkatkhshp-----shadkhqhaptakshhkssahnad-----slpqav--veks-----
Uh-03469    200 ahttskqqtshkkqhhahttskqqtshkeqghqhhaqkshrsqgksgdkgkksqkpdakqhivrpqsqnpstlvagdsppavqgqiekpghshqhqa
Ssci_00044   179 shha--hsnshkhtsh-----ghqqqlkha-----aaps-----tkqa-----
Sr_13312     179 shhahshsqqqqh-----hhkhha-----ssdkphahhaa-----aaps-----tkqa-----

Um11464     238 ---pspkqr---wppreshqa--psssaqadlevlidnlynsaplgshhpnqhddqpp1agthptshrrhrlssrsy-hqrs----htp--
Uh-03469    300 harpsqdqa---appqqrvgasqpsaahdelehnfidgilpaavtgsnhp-ppaqqp-----qrrhrslsghshhrs----hil--
Ssci_00044   206 ---gsgkgs---ykpshqaaa--pstkd-----psqhqrsvdesfs--sqksrkifihtvdr
Sr_13312     218 ---ppqhqrsvvegsssslti--erstssqstdelfidsltsaplgshhpnlsr-----ptlhrhrhsssrsh-qqrs----htp--

```

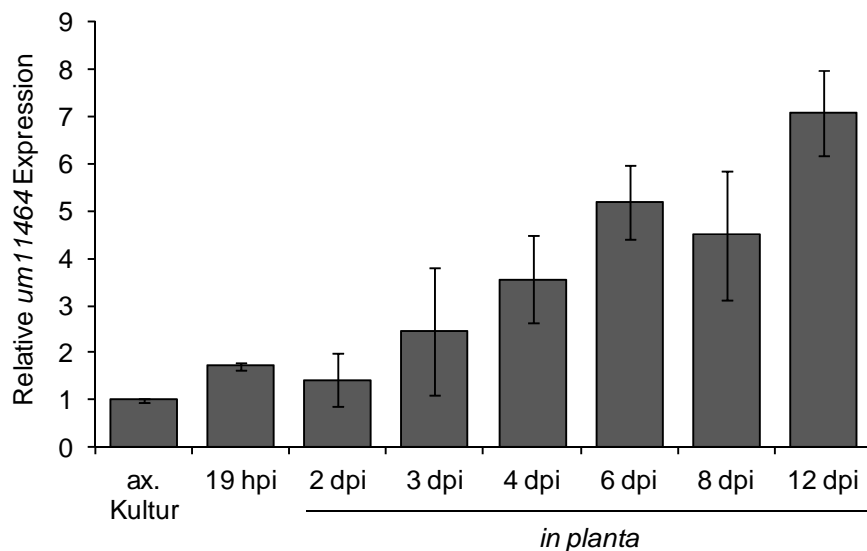
**Abb. 4: Aminosäuresequenzvergleich von Um11464 und orthologen Proteinen verwandter Brandpilze.** Das *U. maydis* Protein Um11464 zeigt eine Aminosäureidentität von 51%, 54% und 64% zu den orthologen Proteinen von *U. hordei* (Uh-03469), *S. scitamineum* (Ssci\_00044; G. Mannhaupt, pers. Mitteilung) und *S. reilianum* (Sr\_13312). Alle Proteine besitzen ein Signalpeptid (rot umrandet) sowie zwei LysM-Domänen (schwarz unterstrichen). Putative N-Glycosylierungsstellen wurden schwarz umrandet, vorhergesagte  $\omega$ -sites wurden durch eine blaue Umrahmung hervorgehoben.

Ein Aminosäuresequenzvergleich von Um11464 zu orthologen Proteinen nahe verwandter Brandpilze ergab, bezogen auf die Proteingesamtlänge, eine Identität von 51% für *U. hordei* (Laurie *et al.*, 2012), 54% für *S. scitamineum* (G. Mannhaupt, pers. Mitteilung) und 64% für *S. reilianum* (Schirawski *et al.*, 2010) (Abb. 4). Vor allem der N-terminale

Bereich, welcher die LysM-Domänen trägt, ist in allen vier Proteinen hoch konserviert und könnte demnach eine entscheidende Rolle für die Funktionalität dieser Proteine spielen.

## 2.2 Regulation der *um11464* Expression während des Lebenszyklus von *U. maydis*

Das Expressionsmuster eines Gens liefert hilfreiche Informationen darüber, in welchem Entwicklungsstadium des Pilzes das Gen eine wichtige Rolle spielen könnte. Die Regulation der *um11464* Expression während des Lebenszyklus von *U. maydis* wurde mittels quantitativer „real-time“ PCR (qPCR) untersucht. Hierfür wurde cDNA unterschiedlicher Wachstumsphasen präpariert. Für die saprophytische Phase wurden exponentiell gewachsene Sporidien des *U. maydis* Stammes SG200 nach Kultivierung in YEPS<sub>L</sub> geerntet, ein *on planta* Zeitpunkt wurde mit 19 h nach Infektion gewählt. Mit den Zeitpunkten 2, 3, 4, 6, 8, und 12 Tagen nach Infektion wurde die Expressionsanalyse von *um11464* während der biotrophen Wachstumsphase abgedeckt. Die *um11464* Expression wurde relativ zur Gesamtmenge des eingesetzten Pilzmaterials, welches durch das konstitutiv exprimierte Referenzgen *ppi* ermittelt wurde, bestimmt. Zur statistischen Absicherung wurde die Analyse mit drei unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt.



**Abb. 5: Expressionsanalyse von *um11464* mittels qPCR.** Die RNA aus axenischer Kultur sowie infizierten Blattmaterials 19 h bzw. 2, 3, 4, 6, 8 und 12 Tage nach Infektion (dpi) wurde für eine Expressionsanalyse mittels qPCR verwendet. Die *um11464* Expression wurde relativ zum konstitutiv exprimierten *ppi* Gen ermittelt. Es wurden drei biologische Replikate durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

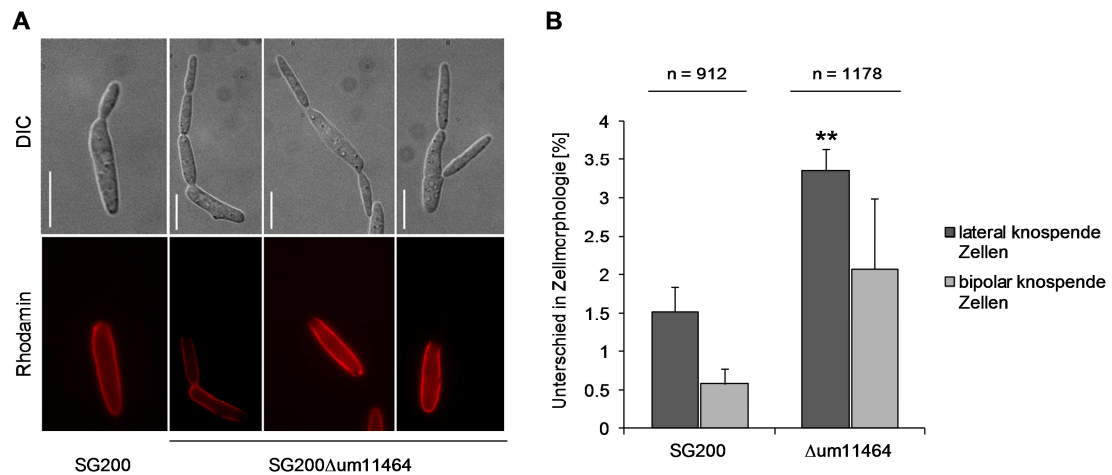
Es zeigte sich, dass *um11464* in axenischer Kultur nur sehr schwach exprimiert wird (Abb. 5). 19 Stunden nach SG200-Infektion hingegen weist *um11464* ein bereits leicht erhöhtes Transkript auf, welches zu späteren Zeitpunkten bis zu 7-fach weiter zunimmt (Abb. 5). Die *um11464* Expression wird somit auf der Pflanzenoberfläche induziert. Dies steht im Einklang mit Transkriptom-Daten zur Genexpression auf hydrophoben Oberflächen, wo *um11464* unabhängig von einem Fettsäurestimulus leicht, aber signifikant hochreguliert wurde (D. Lanver, pers. Mitteilung).

## **2.3 Die Rolle von Um11464 während der saprophytischen Wachstumsphase**

Um die Funktion von Um11464 während des saprophytischen Wachstums zu untersuchen, wurde eine Deletion des Gens *um11464* in dem solopathogenen Stamm SG200 vorgenommen. Dabei konnte kein Unterschied in der Koloniemorphologie auf Minimal- und Vollmedienplatten sowie der Wachstumsrate in axenischer Kultur zwischen der Deletionsmutante SG200 $\Delta$ um11464 und dem Referenzstamm SG200 beobachten werden (nicht gezeigt). Dennoch wurden Sporidien der *um11464* Deletionsmutante hinsichtlich ihrer Morphologie in Flüssigmedium mikroskopisch untersucht sowie der Einfluss von Um11464 auf Stresssensitivität getestet.

### **2.3.1 Um11464 beeinflusst die Zellmorphologie in axenischer Kultur**

Sporidien von SG200 und SG200 $\Delta$ um11464 wurden während der exponentiellen Wachstumsphase mikroskopisch analysiert. Dabei zeigte sich ein deutlicher Unterschied hinsichtlich ihrer Zellmorphologie. Neben dem in axenischer Kultur zu erwartenden hefeartigen Wachstum mit apikaler Knospung wies die *um11464* Deletionsmutante einen signifikant höheren Anteil an Sporidien mit lateraler Knospung auf (Abb. 6A und B). Ebenfalls häufiger, wenn auch nicht signifikant im Vergleich zum Referenzstamm SG200, konnte für SG200 $\Delta$ um11464 die Bildung von Zellketten und bipolar knospenden Zellen beobachtet werden (Abb. 6A und B).



**Abb. 6: Morphologischer Phänotyp der *um11464* Deletionsmutante in axenischer Kultur.**

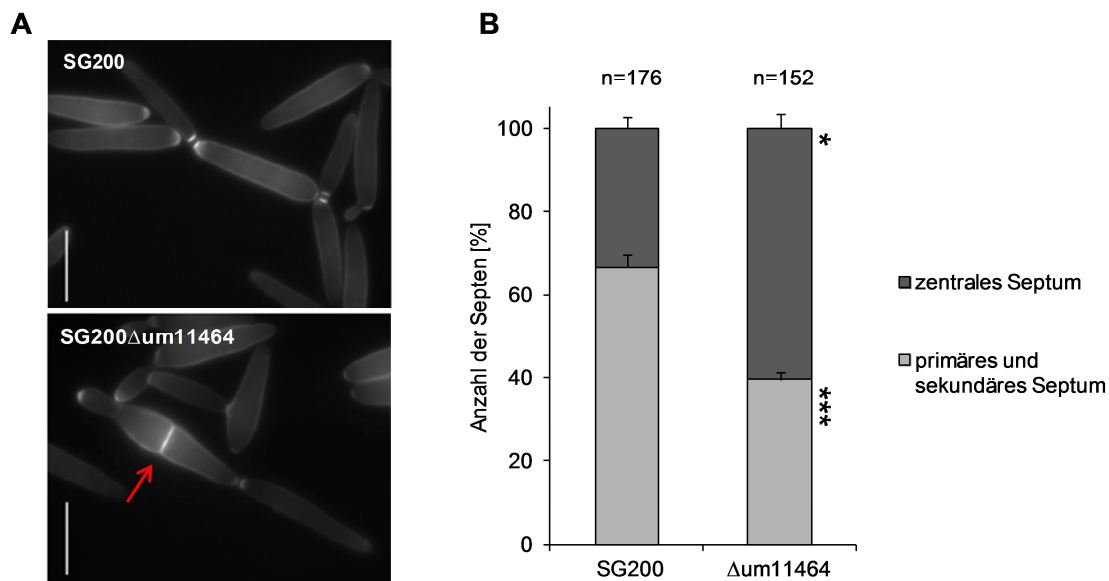
**A:** Sporidien des Referenzstammes SG200 sowie der *um11464* Deletionsmutante wurden während der exponentiellen Wachstumsphase in YEPS<sub>L</sub> mit dem Membran-impermeablen Reagenz NHC-LS-Biotin behandelt und nach weiteren 2 Stunden Wachstum mit einem an das Biotin bindende, TRITC-konjugierte Avidin detektiert. Die entsprechende DIC-Durchlichtaufnahme ist in der oberen Reihe gezeigt. Der Längenmaßstab entspricht 15 µm. **B:** Quantifizierung der morphologischen Veränderung in SG200Δum11464. Es wurden drei unabhängige Kulturen betrachtet, die Werte gemittelt und prozentual zur Gesamtzahl der Zellen (n) dargestellt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Signifikante Unterschiede (\*\*p < 0,005) sind durch Sternchen gekennzeichnet.

Um zu beweisen, dass es sich bei dem beobachteten Phänotyp um bipolare bzw. laterale Knospungen handelte, wurde eine von Böhmer *et al.* (2008) publizierte Methode verwendet. Diese beruht darauf, dass Zellwandproteine exponentiell wachsender Sporidien irreversibel biotinyliert werden und das Biotin auch nach mehreren Teilungsvorgängen noch mittels ExtrAvidin-TRITC detektiert werden kann. Nach Biotinylierung der Zellwandproteine in knospenden Sporidien von SG200 und SG200Δum11464, welche anschließend für weitere 2 Stunden wachsen durften und erst dann mit fluoreszierendem ExtrAvidin-TRITC behandelt wurden, war zu beobachten, dass lediglich die Mutterzellen, nicht aber die daraus resultierenden Tochterzellen gefärbt waren (Abb. 6A, unten). Dabei wies der *um11464* Deletionsstamm im Vergleich zu SG200 mehrere, nicht gefärbte Tochterzellen auf (Abb. 6A, unten).

### 2.3.2 Um11464 wird für eine effiziente Septenbildung benötigt

Die veränderte Zellmorphologie der *um11464* Deletionsmutante in axenischer Kultur ließ vermuten, dass die Septenbildung der Zellen gegenüber dem Referenzstamm beeinträchtigt sein könnte. Die Ausbildung eines primären und eines sekundären Septums ist essentiell für eine erfolgreiche Teilung von *U. maydis* Sporidien (Weinzierl *et al.*, 2002). Um die

Septenbildung zu visualisieren, wurde eine Calcofluorfärbung exponentiell wachsender Sporidien vorgenommen. Dabei zeigte sich, dass die *um11464* Deletionsmutante durchaus beide Septen ausbilden kann, dies jedoch signifikant seltener vorkam als in Sporidien des Referenzstammes SG200 (Abb. 7B). Stattdessen konnte mit erhöhter Frequenz ein sogenanntes „zentrales“ Septum in der Deletionsmutante beobachtet werden (Abb. 7A und B). Es ist davon auszugehen, dass die Ausbildung eines zentralen Septums die Teilungsfähigkeit der Zellen wenn überhaupt, dann nur mäßig beeinträchtigt, da wie schon erwähnt kein vermindertes Wachstum für SG200 $\Delta$ um11464 zu verzeichnen war.



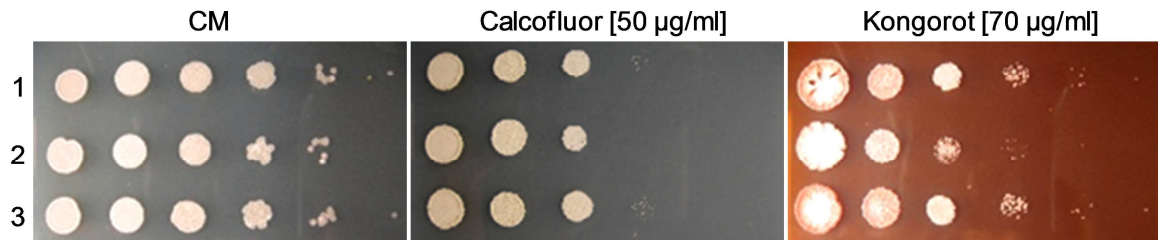
**Abb. 7: Septenbildung in haploiden Sporidien von SG200 und SG200 $\Delta$ um11464.**

**A:** Sporidien des Referenzstammes SG200 sowie der *um11464* Deletionsmutante wurden während der exponentiellen Wachstumsphase in YEPS<sub>L</sub> mit Calcofluor-White behandelt und anschließend mikroskopisch analysiert. Septen sind nach der Färbung deutlich zu erkennen. Ein „zentrales“ Septum in SG200 $\Delta$ um11464 wurde durch einen Pfeil hervorgehoben. Der Größenmaßstab beträgt 15  $\mu$ m. **B:** Quantifizierung des Septenvorkommens in SG200 und SG200 $\Delta$ um11464. Es wurden drei unabhängige Kulturen betrachtet, die Werte gemittelt und prozentual zur Gesamtzahl der Zellen (n) dargestellt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Signifikante Unterschiede (\* $p$ <0,05; \*\*\* $p$ <0,0005) sind durch Sternchen gekennzeichnet.

### 2.3.3 Die Deletion von *um11464* erhöht die Sensitivität gegenüber Zellwandstressoren

Um die Bedeutung von Um11464 unter Stressbedingungen zu testen, wurden SG200, SG200 $\Delta$ um11464 und SG200 $\Delta$ um11464-11464, ein Komplementationsstamm, in dem *um11464* unter Kontrolle des nativen Promotors in Einzelkopie in den *ip*-Lokus des Deletionsstammes integriert wurde, diversen Stressmedien ausgesetzt. Die verwendeten Substanzen zur Induktion von osmotischem Stress (NaCl, Sorbitol) oder oxidativem Stress

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) hatten keine Auswirkung auf das Wachstum der getesteten Stämme (nicht gezeigt). Dahingegen zeigte die *um11464* Deletionsmutante eine erhöhte Sensitivität auf CM-Medium, welches mit Kongorot oder Calcofluor versetzt wurde (Abb. 8). Dieser Wachstumsdefekt konnte durch Integration von *um11464* in den *ip*-Lokus des Deletionsstammes vollständig komplementiert werden (Abb. 8).



**Abb. 8: Stresssensitivität der *um11464* Deletionsmutante.** Serielle Verdünnungen der Stämme SG200 (1), SG200Δ*um11464* (2) und SG200Δ*um11464*-11464 (3) wurden auf CM-Medium mit oder ohne Stressoren getropft und für drei Tage bei 28°C inkubiert. Wachstumsdefekte deuten eine Sensitivität an.

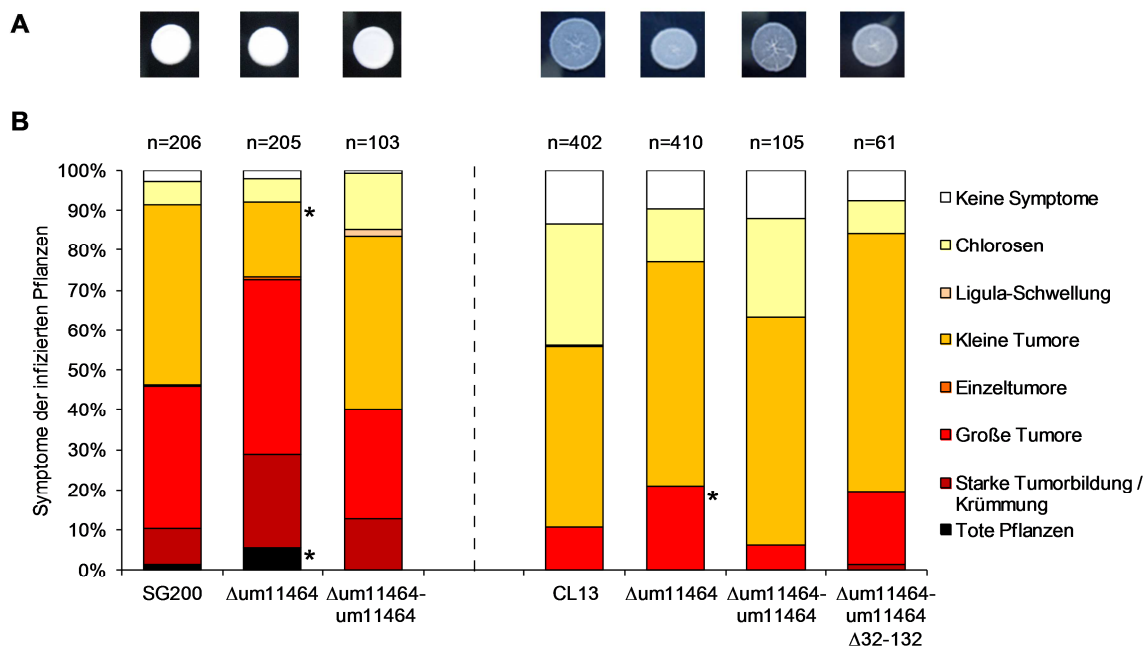
Diese Ergebnisse zeigen, dass Um11464 bereits während des saprophytischen Wachstums einen Einfluss auf die Zellmorphologie und die Stresssensitivität hat. Ob dies zugleich Auswirkungen auf die pathogene Entwicklung von *U. maydis* hat, soll nun im Folgenden näher untersucht werden.

## 2.4 Die Rolle von Um11464 während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*

Um die Bedeutung von Um11464 während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* zu testen, wurden die Stämme SG200 und SG200Δ*um11464* hinsichtlich ihrer Virulenz getestet. Zusätzlich wurde der Virulenzphänotyp in einem weiteren solopathogenen Stamm, CL13, verifiziert. Diesem Stamm fehlt ein autokrines Pheromon/Pheromon-Rezeptor-System (Bölker *et al.*, 1995), weshalb er nur sehr schwach filamentöses Wachstum auf PD-Aktivkohle zeigt und im Vergleich zu SG200 weniger virulent ist (Di Stasio *et al.*, 2009). Geringe Virulenzunterschiede treten in CL13 deutlicher zum Vorschein. Die Analysen wurden durch Komplementationsexperimente in beiden solopathogenen Stämmen abgesichert und durch Überexpressionsanalysen sowie einer Komplementation mit einem orthologen Protein erweitert.

### 2.4.1 Um11464 wirkt sich negativ auf die Virulenz aus

Sieben Tage alte Maispflanzen wurden mittels Spritzinfektion mit den Zellsuspensionen von SG200, SG200 $\Delta$ um11464 sowie dem Komplementationsstamm SG200 $\Delta$ um11464-um11464, welcher *um11464* in Einzelkopie trägt, infiziert und die Pflanzensymptome zwölf Tage nach Infektion quantifiziert. Alle Stämme wiesen vergleichbare Filamentbildung auf aktivkohle-haltigem Medium auf (Abb. 9A). Im Vergleich zum Referenzstamm SG200 zeichnete sich für die *um11464* Deletionsmutante jedoch ein hypervirulenter Phänotyp ab, welcher sich durch signifikant mehr tote Pflanzen, deutlich stärkere Tumorbildung mit Achsenkrümmung sowie signifikant weniger kleineren Tumoren äußerte (Abb. 9B). Der Komplementationsstamm zeigte eine zu SG200 vergleichbare Virulenz (Abb. 9B).



**Abb. 9: Virulenz von *um11464* Mutanten und Komplementationsstämmen in SG200 und CL13-Hintergrund.** **A:** Filamentbildung der unter B angegebenen Stämme auf Aktivkohle-haltigem Medium. **B:** Zellsuspensionen der angegebenen Stämme wurden mittels Spritzinfektion in sieben Tage alte Maispflanzen injiziert. Pflanzensymptome wurden zwölf Tage nach Infektion quantifiziert und je nach Stärke in verschiedene Kategorien unterteilt (Kämper *et al.*, 2006). Es wurden mindestens drei unabhängige Infektionen vorgenommen, deren Werte gemittelt und prozentual zur Gesamtzahl der infizierten Pflanzen (n) dargestellt. Signifikante Unterschiede (\* $p < 0,05$ ) sind durch Sternchen gekennzeichnet.

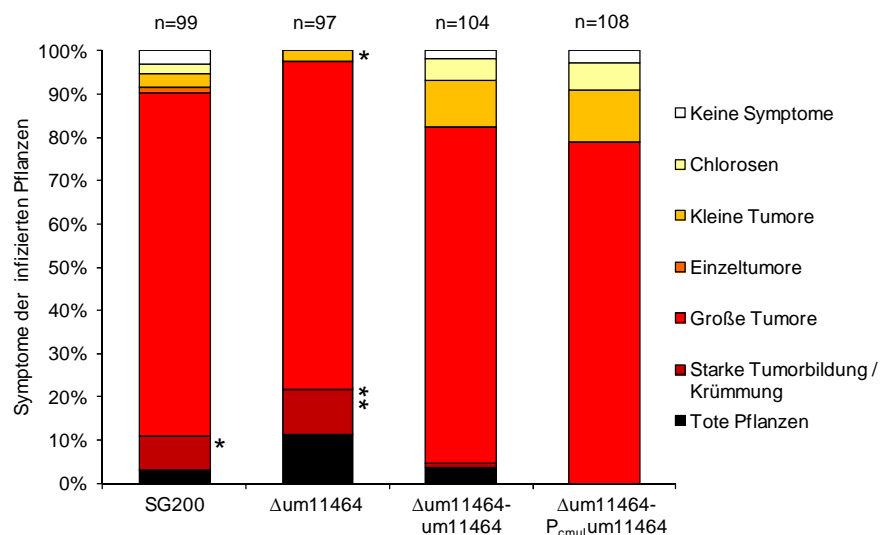
Zur Verifizierung des Phänotyps wurde der Virulenztest zudem mit den Stämmen CL13 und CL13 $\Delta$ um11464 wiederholt. Auch in diesem Fall wiesen Pflanzen, die mit der *um11464* Deletionsmutante infiziert wurden, signifikant mehr große Tumore auf (Abb. 9B). Für die Komplementation wurde *um11464* unter Kontrolle des nativen Promotors und



einem C-terminalen HA-Epitop in den *ip*-Lokus von CL13 $\Delta$ um11464 integriert. Es zeigte sich für diesen Stamm eine zu CL13 vergleichbare Virulenz (Abb. 9B). Allerdings konnte der Virulenzphänotyp nicht komplementiert werden, wenn *um11464* ohne seine LysM-Domänen (Aminosäuren 32-132) in den *ip*-Lokus des Deletionsstammes integriert wurde (Abb. 9B). Dies deutet an, dass Um11464 die Virulenz von *U. maydis* negativ beeinflusst und dass dieser Effekt auf die LysM-Domänen zurückzuführen ist.

## 2.4.2 Die Überexpression von *um11464* reduziert die Tumorbildung in Pflanze

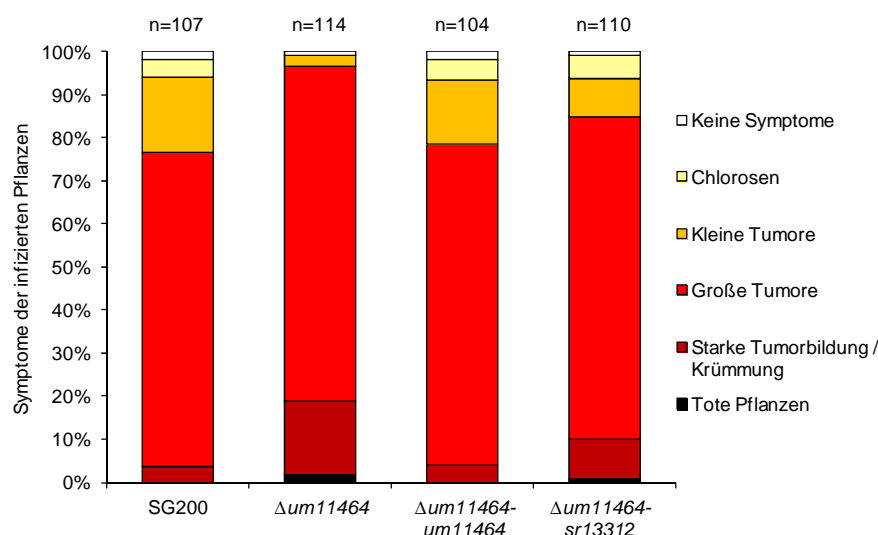
Um zu überprüfen, ob sich der hypervirulente Phänotyp der *um11464* Deletionsmutante durch Überexpression umkehren lässt, wurde *um11464* unter Kontrolle des sehr stark *in planta* induzierten *cmuI* Promotors (Djamei *et al.*, 2011) in Mehrfachkopie in den *ip*-Lokus des Stammes SG200 $\Delta$ um11464 integriert. In Infektionen mit SG200 $\Delta$ um11464-*P<sub>cmuI</sub>*-11464HA zeigte sich eine im Vergleich zum Referenzstamm SG200 und dem *um11464* Deletionsstamm signifikant verminderte Tumorbildung (Abb. 10). Die Überexpressionsversuche lassen demnach vermuten, dass Um11464 möglicherweise direkt oder indirekt als Elicitor fungiert und eine verstärkte pflanzliche Abwehrreaktion induzieren könnte.



**Abb. 10: Virulenz des Überexpressionsstammes SG200 $\Delta$ um11464-*P<sub>cmuI</sub>*-11464HA.** Sieben Tage alte Maispflanzen wurden wie in Abb. 9 beschrieben mit den angegebenen *U. maydis* Stämmen infiziert und Pflanzensymptome zwölf Tage nach Infektion quantifiziert. Nach mindestens drei unabhängigen Infektionen wurden die Werte gemittelt und prozentual zur Gesamtzahl der infizierten Pflanzen (n) dargestellt. Signifikante Unterschiede (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ) sind durch Sternchen gekennzeichnet.

### 2.4.3 Der $\Delta um11464$ Virulenzphänotyp kann durch das *S. reilianum* Ortholog partiell komplementiert werden

Aufgrund der Aminosäuresequenz-Übereinstimmung von 64% zwischen den orthologen Volllängeproteinen Um11464 von *U. maydis* und Sr13312 von *S. reilianum* (vgl. Kapitel 2.1) lag die Vermutung nahe, dass beide Proteine auch eine ähnliche Funktion übernehmen. Um dies zu überprüfen, wurde das *S. reilianum* Gen *sr13312* unter Kontrolle des nativen *um11464* Promotors in einfacher Kopienzahl in den *ip*-Lokus des *um11464* Deletionsstammes integriert und der resultierende Stamm für Pflanzeninfektionen verwendet. Während der Komplementationsstamm SG200 $\Delta um11464$ -11464HA eine zu SG200 vergleichbare Virulenz zeigte, ließ sich der hypervirulente Phänotyp der *um11464* Deletionsmutante in *U. maydis* nur partiell durch das orthologe *S. reilianum* Gen komplementieren (Abb. 11).



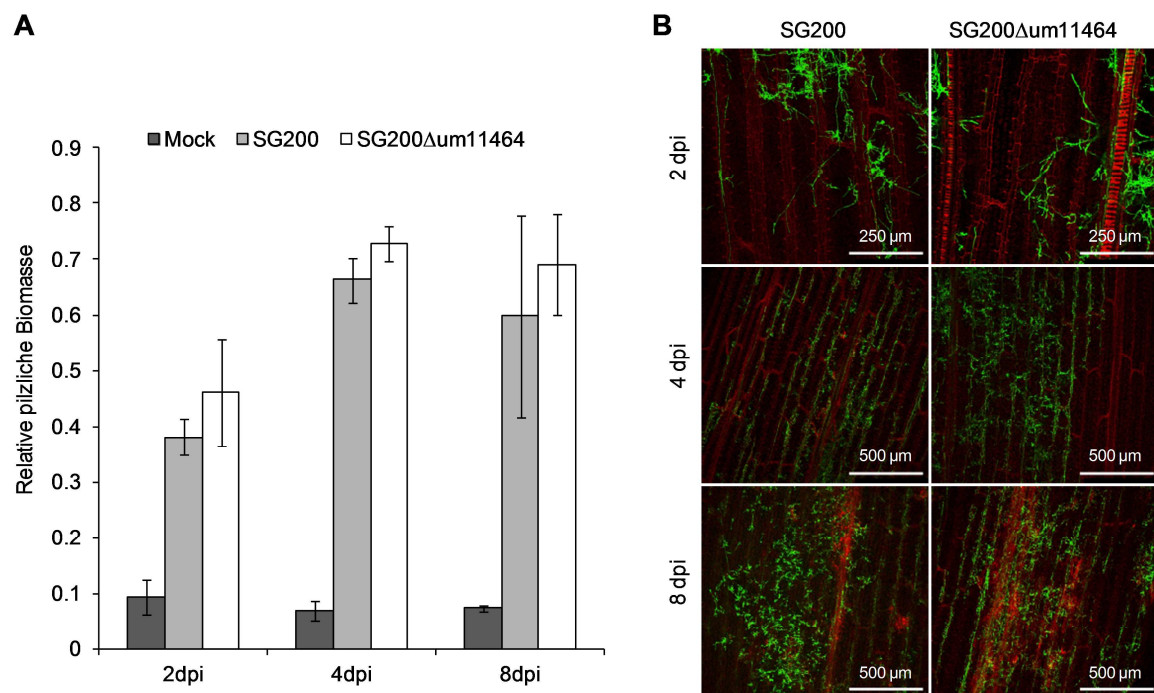
**Abb. 11: Virulenz von SG200, SG200 $\Delta um11464$  sowie den Komplementationsstämmen SG200 $\Delta um11464$ -11464HA und SG200 $\Delta um11464$ -*sr13312*HA.** Zellsuspensionen der angegebenen Stämme wurden mittels Spritzinfektion in sieben Tage alte Maispflanzen injiziert. Pflanzensymptome wurden zwölf Tage nach Infektion quantifiziert. Die Werte von mindestens drei unabhängigen Infektionen wurden gemittelt und prozentual zur Gesamtzahl der infizierten Pflanzen (n) dargestellt.

### 2.4.4 Die Kolonisation von Pflanzengewebe wird durch Um11464 nicht beeinflusst

Aufgrund des beobachteten Virulenzphänotyps der *um11464* Deletionsmutante wurde vermutet, dass eine erhöhte Kolonisierung des Pflanzengewebes im Vergleich zum Referenzstamm SG200 vorliegen könnte. Um dies zu testen, kamen zwei verschiedene Methoden zum Einsatz. Zum einen wurde das dritte Blatt infizierter Maispflanzen

präpariert, indem ein 2 cm langes Stück etwa 1 cm unterhalb der Infektionsstelle ausgeschnitten wurde. Blattproben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der biotrophen Entwicklung von *U. maydis* geerntet, Gesamt-DNA extrahiert und die pilzliche Biomasse mittels quantitativer „real time“ PCR (qPCR) bestimmt. Dabei wurde die Transkriptmenge des pilzlichen „house-keeping“ Gens *ppi* in Relation zur Transkriptmenge des pflanzlichen Gens *GAPDH* gesetzt.

Zum anderen wurde die Proliferation in Pflanze durch konfokale Mikroskopie überprüft. Hierfür wurde das infizierte Gewebe des dritten Blattes mit WGA-AF488 / Propidium-Iodid (PI) gefärbt, wobei die Pflanzenzellwand durch PI rot, der Pilz durch das AF488-konjugierte Lectin WGA (*wheat germ agglutinin*) grün gefärbt wurde. Zwei, vier und acht Tage nach Infektion konnte weder durch qPCR noch durch konfokale Mikroskopie ein signifikanter Unterschied in der Pilzproliferation zwischen SG200 und SG200 $\Delta$ um11464 beobachtet werden (Abb. 12).



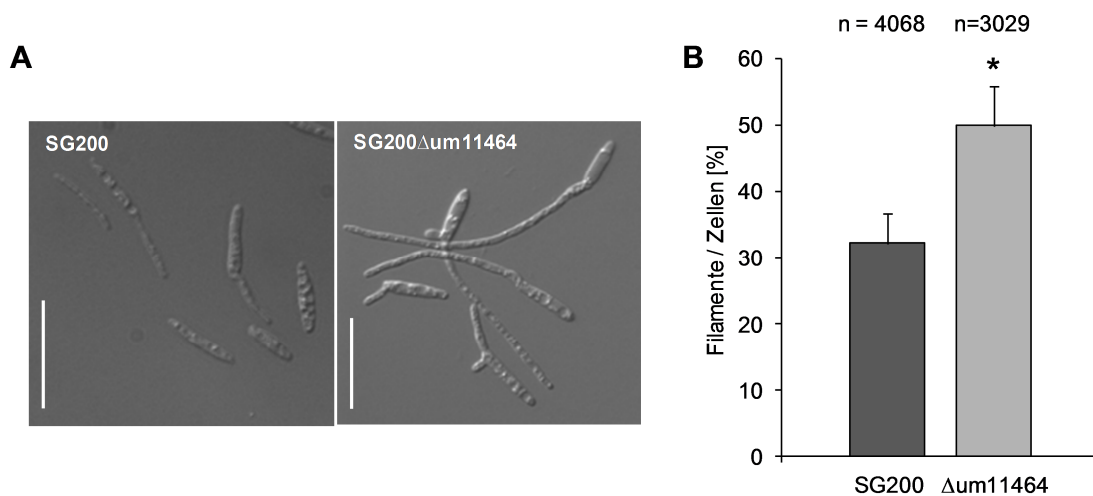
**Abb. 12: Kolonisation des Pflanzengewebes durch SG200 und SG200 $\Delta$ um11464. A:** Quantifizierung der pilzlichen Biomasse durch qPCR. Die infizierten Bereiche des dritten Blattes wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet, zur Gesamt-DNA-Isolation und anschließender qPCR verwendet. Blattbereiche uninfizierter Pflanzen dienen als Kontrolle. Gezeigt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten, in denen jeweils 10 Blätter pro Stamm analysiert wurden. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. **B:** Proliferation von SG200 und SG200 $\Delta$ um11464 im Pflanzengewebe. Die infizierten Bereiche des dritten Blattes wurden zu gleichen Zeitpunkten wie in A geerntet, mit WGA-AF488/PI gefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Die Pflanzenzellwand ist durch PI rot, die Pilzhyphen durch WGA-AF488 grün dargestellt. Der Größenmaßstab ist in den jeweiligen Abbildungen angegeben.

## 2.5 Die Rolle von Um11464 bei der Bildung von Infektionsstrukturen

Um zu untersuchen, ob Um11464 bereits in einem frühen Stadium der pathogenen Entwicklung, nämlich während der Ausbildung von Infektionsstrukturen, eine entscheidende Rolle spielt, wurde die Reaktion der *um11464* Deletionsmutante auf Pflanzenstimuli wie Hydrophobizität und Fettsäuren getestet. Hierzu wurde das von Mendoza-Mendoza *et al.* (2009) etablierte *in vitro* Differenzierungssystem verwendet.

### 2.5.1 Die *um11464* Mutante zeigt eine verstärkte Reaktion auf Hydroxy-Fettsäuren

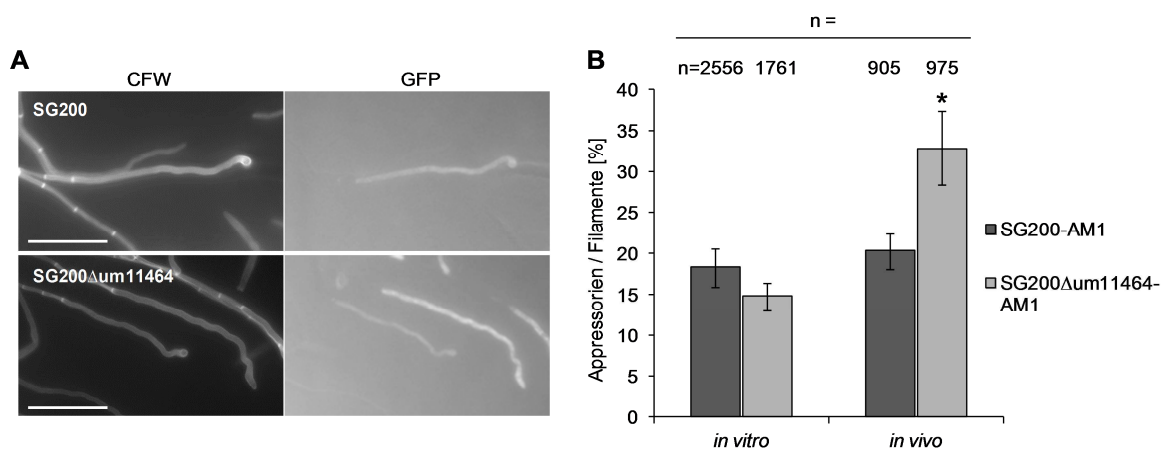
Um die Reaktion der *um11464* Deletionsmutante auf den Fettsäurestimulus 16-Hydroxy-Palmitinsäure (HPS) unabhängig von einer hydrophoben Oberfläche zu testen, wurde SG200 und SG200 $\Delta$ um11464 in 2% YEPS<sub>L</sub> mit 100  $\mu$ M HPS induziert und die Filamentbildung nach 18 h quantifiziert. Es war zu beobachten, dass die Filamentbildung der *um11464* Deletionsmutante im Vergleich zum Referenzstamm SG200 signifikant erhöht war (Abb. 13B).



**Abb. 13: Morphologische Reaktion der *um11464* Deletionsmutante auf Hydroxy-Fettsäuren.** **A:** Die Filamentbildung in SG200 und SG200 $\Delta$ um11464 wurde durch Inkubation der Stämme in 2% YEPS<sub>L</sub> mit 100  $\mu$ M HPS für 18 h induziert. Der Größenmaßstab beträgt 15  $\mu$ m. **B:** Quantifizierung der Filamentbildung. Sporidien der angegebenen Stämme wurden wie in A beschrieben mit HPS induziert. Es wurden drei unabhängige Kulturen betrachtet und der prozentuale Anteil an Filamenten zur Gesamtzellzahl (n) ermittelt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Signifikante Unterschiede (\* $p < 0,05$ ) sind durch Sternchen gekennzeichnet.

## 2.5.2 Die *um11464* Mutante bildet verstärkt Appressorien auf der Blattoberfläche

Im Folgenden wurde der Effekt einer hydrophoben Oberfläche in Kombination mit einem Fettsäurestimulus auf die Appressorienbildung näher untersucht. Hierfür wurden die Stämme SG200 und SG200 $\Delta$ um11464 mit dem Plasmid pAM1 (*Appressorial marker 1*) transformiert (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009). Dieses führt zur Expression von *3xegfp* durch den *um01779* Promotor, welcher spezifisch in den Hyphenspitzen Appressorienbildender Zellen induziert wird (Abb. 14A). Die GFP-Fluoreszenz erleichtert die Erkennung von Appressorien.



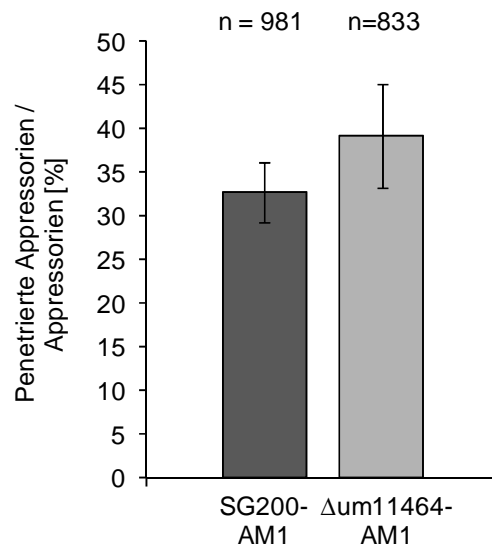
**Abb. 14: Appressorienbildung der *um11464* Deletionsmutante auf Parafilm und auf Maisblättern.** **A:** Appressorien-bildende Filamente auf Parafilm. SG200-AM1 und SG200 $\Delta$ um11464-AM1 wurden in 2% YEPS<sub>L</sub> zu einer OD von 0,2 aufgenommen und nach Zugabe von 100  $\mu$ M HPS mittels Sprüh-Inokulation auf einen mit Parafilm ausgekleideten Objektträger aufgebracht. Nach 18-stündiger Inkubation wurden die Filamente mit Calcofluor (CFW) gefärbt (links). Das GFP-Signal in den Spitzenzellen visualisiert die Appressorienbildung (rechts). **B:** Sporidien von SG200-AM1 und SG200 $\Delta$ um11464-AM1 wurden wie in A beschrieben behandelt und auf Parafilm gesprüht. Nach 18-stündiger Inkubation bei 28°C wurde die Anzahl Appressorien-bildender Filamente zur Gesamtzahl aller Filamente (n) mikroskopisch bestimmt. Zusätzlich wurden Maispflanzen mit den angegebenen Stämmen infiziert und Appressorien 18 h nach Infektion wie beschrieben quantifiziert. Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente für die *in vitro* und *in vivo*-Analyse durchgeführt. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. Signifikante Unterschiede (\* $p < 0,05$ ) sind durch Sternchen gekennzeichnet.

Für die *in vitro* Quantifizierung von Appressorien wurden die entsprechenden Stämme in 2% YEPS<sub>L</sub> zu einer OD von 0,2 aufgenommen und die Suspension nach Zugabe von HPS mittels Sprüh-Inokulation auf einen mit Parafilm ausgekleideten Objektträger aufgebracht. Nach Inkubation bei 28°C für 18 h wurde die Anzahl der Filamente mit Appressorium zur Gesamtzahl aller Filamente mikroskopisch bestimmt. Dabei konnte kein Unterschied in der Appressorienbildung zwischen der *um11464* Deletionsmutante und dem Referenzstamm beobachtet werden (Abb. 14A und B). Die Quantifizierung von Appressorien 18 h nach

Maisinfektion hingegen ergab eine im Vergleich zu SG200 signifikant erhöhte Appressorienbildung für die *um11464* Deletionsmutante (Abb. 14B). Der Unterschied zur *in vitro*-Analyse lässt vermuten, dass ein weiterer, bisher unbekannter Reiz der Pflanzenoberfläche die Appressorienbildung der *um11464* Deletionsmutante begünstigt.

### 2.5.3 Die Penetration der Pflanzenoberfläche wird durch Um11464 nicht beeinflusst

Nachdem eine erhöhte Appressorienbildung der *um11464* Deletionsmutante auf der Pflanzenoberfläche beobachtet wurde, war es im Folgenden interessant zu analysieren, ob diese auch mit erhöhter Effizienz penetrierten. Dazu wurde das jeweils dritte Blatt von mit SG200-AM1 und SG200 $\Delta$ um11464-AM1 infizierten Maispflanzen mikroskopisch analysiert. Appressorien-bildende Hyphen konnten durch die GFP-Expression in der Hyphenspitze identifiziert werden. Zusätzlich wurden die Pilzhypen mit Calcofluor gefärbt. Da dieses nicht in die Pflanzenzelle aufgenommen wird, konnte zwischen penetrierten Hyphen und solchen, die sich ausschließlich auf der Blattoberfläche befanden, unterschieden werden.



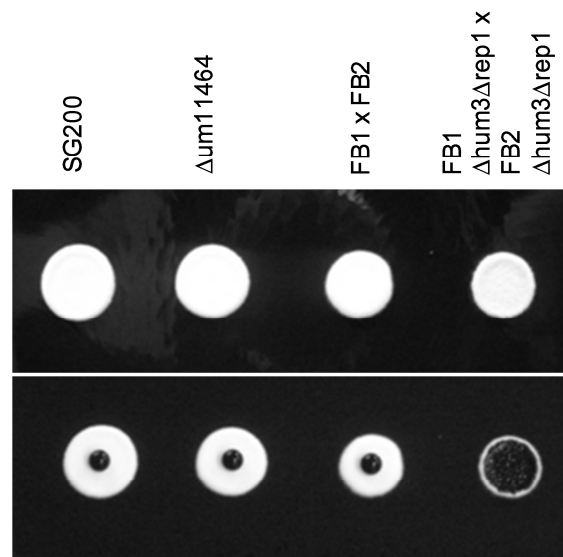
**Abb. 15: Quantifizierung der Penetrationseffizienz von Appressorien der *um11464* Deletionsmutante.** Maispflanzen wurden in drei unabhängigen Infektionen mit SG200-AM1 und SG200 $\Delta$ um11464-AM1 infiziert und 20 h nach Infektion mikroskopisch analysiert. Dabei wurde der prozentuale Anteil penetrierter Appressorien zur Gesamtzahl aller Appressorien-bildender Filamente (n) bestimmt. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an.

Eine Quantifizierung der Penetrationsereignisse 20 h nach Maisinfektion mit SG200-AM1 und SG200 $\Delta$ um11464-AM1 ergab eine für die *um11464* Deletionsmutante leicht erhöhte Penetrationseffizienz, welche jedoch nicht signifikant war (Abb. 15).

#### **2.5.4 Die Oberflächenhydrophobizität von Hyphen wird durch Um11464 nicht beeinflusst**

Da nicht nur pflanzliche Stimuli, sondern auch die Beschaffenheit der pilzlichen Zellwand/Oberfläche selbst Einfluss auf die Differenzierung, Adhäsion und somit dem Pathogenitätsverlauf eines phytopathogenen Pilzes nehmen (Tucker und Talbot, 2001; Wessels, 1996), sollte im Folgenden untersucht werden, ob eine veränderte Oberflächenhydrophobizität filamentöser Kolonien von SG200 und SG200 $\Delta$ um11464 für den Virulenzunterschied in Pflanze verantwortlich gemacht werden kann. Hierfür wurde nach einer leicht modifizierten Version von Müller *et al.* (2008) vorgegangen. Zunächst wurden Zellsuspensionen von SG200, SG200 $\Delta$ um11464 sowie Kreuzungen der kompatiblen Wildtyp-Stämme FB1 und FB2 und deren  $\Delta$ hum3 $\Delta$ rep1 Derivate auf Aktivkohle-haltiges CM-Festmedium getropft und für 48 h bei 28°C inkubiert. Anschließend wurde ein Tropfen 0,25% Evans-Blue Lösung auf die filamentös gewachsenen Kolonien gegeben. Neben der Analyse der Tropfenform wurde auch die Zeit gestoppt, die es für die Absorption des Tropfens benötigte. Zur genaueren Bestimmung der Oberflächenhydrophobizität wurde zudem eine Kontaktwinkelberechnung nach Doehlemann *et al.* (2006) vorgenommen.

Für die beiden Wildtyp-Stämme SG200 und FB1xFB2 als auch für SG200 $\Delta$ um11464 zeigte sich eine runde Tropfenform (Abb. 16), welche bis zu 72 h zur Absorption benötigte (nicht gezeigt). Alle drei Stämme wiesen eine hohe Oberflächenhydrophobizität mit Kontaktwinkeln von 120,8° (SG200), 121,1° (SG200 $\Delta$ um11464) und 104,9° (FB1xFB2) auf. Das sofortige Ausbreiten des Tropfens auf der Kolonie des FB1 $\Delta$ hum3 $\Delta$ rep1xFB2 $\Delta$ hum3 $\Delta$ rep1 Kreuzungsstammes in Kombination mit einem sehr niedrigen Kontraktwinkel von 3,99° kennzeichnete hingegen eine stark verminderte Hydrophobizität der pilzlichen Oberfläche (Müller *et al.*, 2008) (Abb. 16).



**Abb. 16: Bestimmung der pilzlichen Oberflächenhydrophobizität.** Die auf Aktivkohlehaltigem Medium filamentös gewachsenen Stämme SG200, SG200 $\Delta$ um11464, die Kreuzungen der kompatiblen Wildtyp-Stämme FB1 und FB2 sowie deren  $\Delta$ hum3 $\Delta$ rep1 Derivate wurden mit einem Tropfen Evans-Blue Lösung versehen. Die runde Tropfenform bzw. die Ausbreitung und das Einziehen des Tropfens geben erste Hinweise auf die pilzliche Oberflächenhydrophobizität.

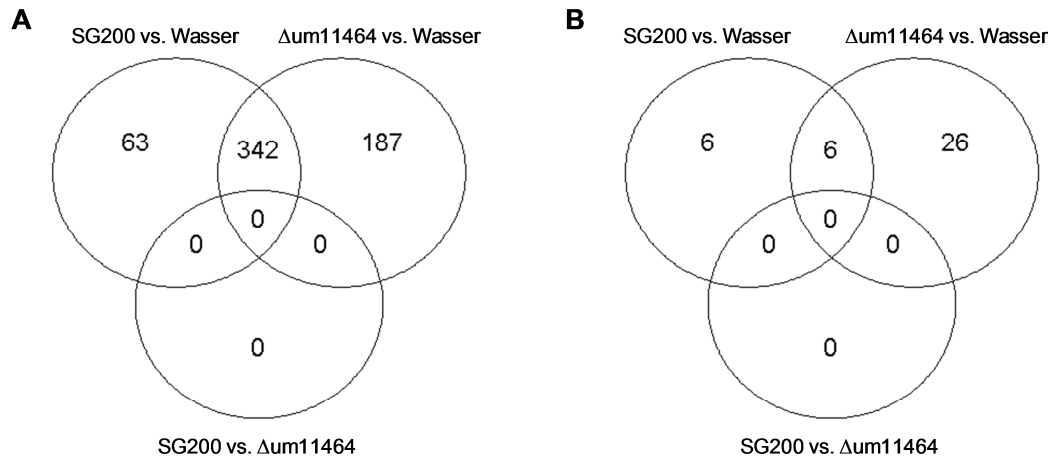
## 2.6 Transkriptionelle Reaktion der Pflanze auf Infektion mit der *um11464* Mutante

Aus den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit geht hervor, dass *um11464* Deletionsmutanten verstärkt Appressorien auf Pflanze bilden. Um herauszufinden, ob die vermehrte Bildung von Infektionsstrukturen allein der Grund für den in Pflanze zu beobachtenden hypervirulenten Phänotyp ist oder ob Um11464 aktiv in die pflanzliche Genexpression während dieser frühen Infektionsphase von *U. maydis* eingreift, wurden vergleichende Transkriptomanalysen von mit SG200 und SG200 $\Delta$ um11464 infizierten Pflanzen durchgeführt. Da die Appressorienbildung bereits 12 h nach Maisinfektion initiiert wird, wurden Blattproben dieses frühen Infektionsstadiums geerntet, die RNA daraus isoliert und mittels RNASeq analysiert. Dabei wurden drei biologische Replikate angefertigt. Änderungen der Genexpression wurden relativ zu mit Wasser infizierten Pflanzen normalisiert.

Für einen globalen Überblick über die Menge der differenziell regulierten Pflanzengene wurde zwischen hoch- und herunterregulierten Genen differenziert und nur jene differenziell regulierten Gene als signifikant betrachtet, deren Irrtumswahrscheinlichkeit (FDR, „false discovery rate“)  $< 5\%$  war. Mittels *R* und unter Verwendung der Funktion „get venn“ (Skript siehe CD im Anhang) wurden diese Gene in Form eines



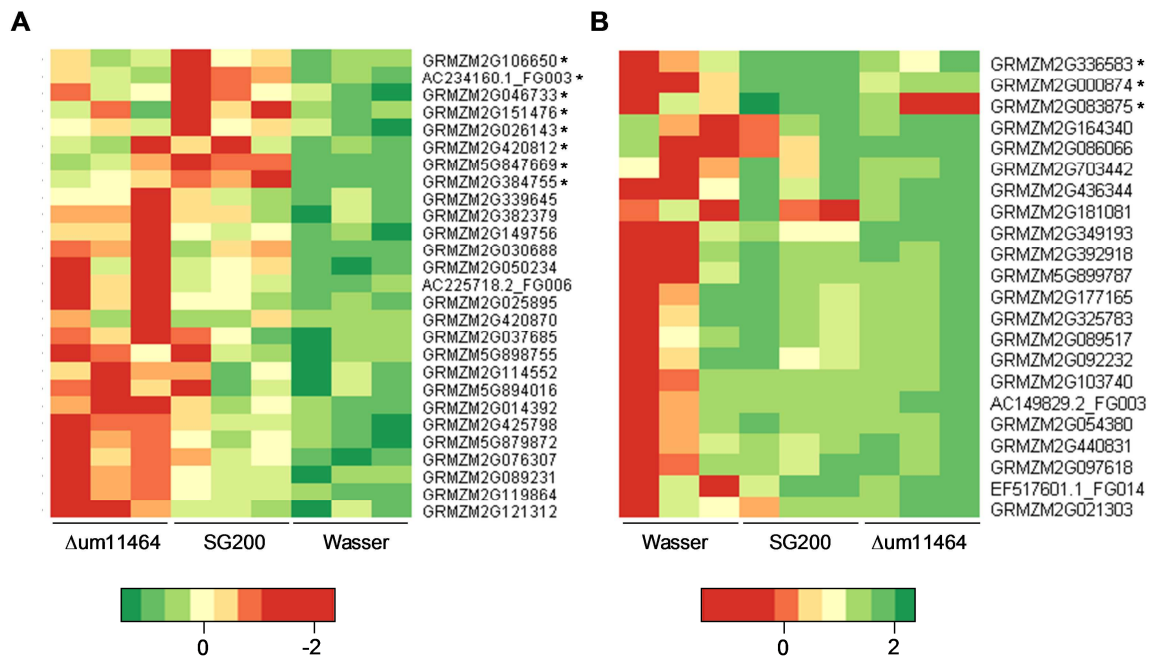
Mengendiagramms veranschaulicht. Dabei zeigte sich, dass beim direkten Vergleich der Genexpression zwischen SG200 und SG200 $\Delta$ um11464 unter den gegebenen Bedingungen kein Genkandidat als signifikant differenziell reguliert eingestuft werden konnte (Abb. 17).



**Abb. 17: Mengendiagramm zur Veranschaulichung der durch SG200 und SG200 $\Delta$ um11464 differenziell regulierten Pflanzengene.** SG200 und SG200 $\Delta$ um11464-infiziertes Blattmaterial wurde 12 h nach Infektion für eine vergleichende Transkriptomanalyse mittels RNASeq verwendet. Dabei diente mit Wasser infiziertes Blattmaterial der Normalisierung der Expressionsdaten. Differenziell regulierte Gene wurden als signifikant betrachtet, wenn ihre Irrtumswahrscheinlichkeit  $< 5\%$  war. Mittels *R* und unter Verwendung der Funktion „*get venn*“ wurden diese Gene in hoch- (A) und herunterregulierte Gene (B) unterteilt und in Form eines Mengendiagramms veranschaulicht.

Da ein direkter Vergleich zwischen SG200 und SG200 $\Delta$ um11464 zur Detektion differenziell regulierter Gene nicht möglich war, wurde sich im Folgenden auf die individuell durch SG200 oder SG200 $\Delta$ um11464 regulierten Gene konzentriert. Dabei fiel auf, dass die herunterregulierten Gene in dieser RNASeq-Analyse stark unter-repräsentiert waren (Abb. 17). Während 63 Gene nach SG200-Infektion und 187 Gene nach SG200 $\Delta$ um11464-Infektion hochreguliert wurden, waren es nur 6 bzw. 26 signifikant differenziell herunterregulierte Gene unter gleichen Analysebedingungen (Abb. 17). Es schien außerdem interessant der Frage nachzugehen, welche dieser Gene nach SG200-Infektionen, nicht aber in SG200 $\Delta$ um11464-Infektionen signifikant induziert werden bzw. welche Gene spezifisch nur nach Infektion mit dem *um11464* Deletionsstamm induziert werden. Hierfür wurden neue Stringenzbedingungen festgelegt, wobei differenziell regulierte Gene erst dann als signifikant betrachtet wurden, wenn ihr „bereinigter“ p-Wert („*adj. P-value*“) unter 20% lag und die Irrtumswahrscheinlichkeit (FDR, „*false discovery rate*“)  $< 5\%$  war. Eine hierarchische Cluster-Analyse (Skript siehe CD im Anhang) unter diesen Stringenzbedingungen ergab, dass nach Infektion mit SG200 8 Gene signifikant in ihrer Expression hochreguliert waren, nach Infektion mit SG200 $\Delta$ um11464 hingegen 19

Gene induziert wurden (Abb. 18A). Im Falle der herunterregulierten Gene waren nur 3 signifikant differenziell nach SG200-Infektion reguliert, während 19 Gene nach Infektion mit SG200 $\Delta$ um11464 herunterreguliert wurden (Abb. 18B). Teilweise war hierbei eine relativ große Varianz der Genexpressionswerte zwischen den einzelnen biologischen Replikaten zu beobachten (Abb. 18A und B), was auch über qPCR-Analysen ausgewählter Gene bestätigt werden konnte (nicht gezeigt).



**Abb. 18: Hierarchische Cluster-Analyse der durch SG200 und  $\Delta$ um11464 signifikant regulierten Pflanzengene 12 h nach Maisinfektion.** SG200 und SG200 $\Delta$ um11464-infiziertes Blattmaterial wurde wie in Abb. 17 beschrieben analysiert. Dabei wurden nur jene Gene in Betracht gezogen, die spezifisch entweder nach SG200-Infektion oder SG200 $\Delta$ um11464-Infektion signifikant differenziell reguliert wurden. Ein Gen galt als signifikant differenziell reguliert, wenn sein bereinigter p-Wert unter 20% lag. Mittels R und unter Verwendung der Funktion „heatmap 2“ (basierend auf Mortazavi *et al.*, 2008) wurde eine hierarchische Cluster-Analyse dieser Gene für die einzelnen biologischen Replikate durchgeführt. Diese Funktion beinhaltet eine Normalisierung gegen die Transkriptlänge sowie die Gesamtmenge der sequenzierten „reads“. **A:** Hierarchische Cluster-Analyse der durch SG200 und SG200 $\Delta$ um11464 signifikant hochregulierten Gene. Die Irrtumswahrscheinlichkeit zur Detektion der Genkandidaten lag bei < 1%. Die Farbskalierung zum Expressionswert eines jeden Gens erfolgte manuell, um gegen die Varianz zwischen den biologischen Replikaten sowie der durchschnittlichen Genexpression pro Replikat zu normalisieren. Die durchschnittlichen Expressionswerte der Wasserkontrolle sind grün dargestellt. Zunehmende Expressionwerte (negatives Vorzeichen) wurden durch die Farbabstufungen von gelb, über orange bis rot dargestellt. Die Accession-Nummern der jeweiligen Gene sind rechts angegeben. Sternchen kennzeichnen jene Gene, die durch SG200, jedoch nicht durch SG200 $\Delta$ um11464 signifikant reguliert wurden. **B:** Hierarchische Cluster-Analyse der durch SG200 und SG200 $\Delta$ um11464 signifikant herunterregulierten Gene. Die Irrtumswahrscheinlichkeit zur Detektion der Genkandidaten lag bei < 5%. Die Farbskalierung der Expressionswerte erfolgte wie in A beschrieben. Die durchschnittlichen Expressionswerte der Wasserkontrolle sind rot dargestellt. Abnehmende Expressionwerte (positives Vorzeichen) wurden durch die Farbabstufungen von orange, über gelb bis grün dargestellt. Die Accession-Nummern der jeweiligen Gene sind rechts angegeben. Sternchen kennzeichnen jene Gene, die durch SG200, jedoch nicht durch SG200 $\Delta$ um11464 signifikant reguliert wurden.

Eine Annotation der spezifisch nach SG200 $\Delta$ um11464-Infektion induzierten Maisgene ergab, dass es sich im Vergleich zu SG200 vorwiegend um induzierte Abwehrgene, Gene zur Modifikation der pflanzlichen Zellwand sowie interessanterweise um Gene handelte, die für DNA- und RNA-bindende Proteine kodieren und eine Rolle in Transkription und Translation übernehmen (Tab. 1). Die Expression von Transkriptionsfaktoren in einem so frühen Infektionsstadium ist dabei neu und spiegelt sich nicht in den bereits veröffentlichten Microarray-Analysen von Maispflanzen nach Infektion mit SG200 wider (Doehlemann *et al.*, 2008).

**Tab. 1: Detektierte Maisgene, die spezifisch nur nach SG200-Infektionen bzw. nur nach SG200 $\Delta$ um11464-Infektionen induziert wurden**

Genname	Annotation <sup>1</sup>	„adj. P-value“ SG200	„adj. P-value“ $\Delta$ um11464
<b>Hochregulierte Gene, die nur nach SG200-Infektionen induziert wurden</b>			
AC234160.1_FG003	mögliche O-Glucosyl-Hydrolase Aktivität	0.005	0.697
GRMZM2G026143	unbekanntes Protein	0.006	0.355
GRMZM2G046733	unbekanntes Protein	0.009	0.261
GRMZM2G106650	ähnlich zu Cytochrome P450 ( <i>A. thaliana</i> )	0.003	0.950
GRMZM2G151476	$\beta$ -Ketoacyl-ACP-Synthase I	0.007	0.773
GRMZM2G384755	hypothetisches Protein	0.003	0.415
GRMZM2G420812	SAUR31, Auxin-responsive SAUR Protein	0.006	0.232
GRMZM5G847669	Serine-type Endopeptidase-Inhibitor	0.003	0.322
<b>Hochregulierte Gene, die nur nach SG200<math>\Delta</math>um11464-Infektionen induziert wurden</b>			
AC225718.2_FG006	EF-hand Ca <sup>2+</sup> -bindendes Protein CCD1	0.329	6.049e-05
GRMZM2G014392	9-cis-Epoxycarotenoid-Dioxygenase- Aktivität	0.498	0.004
GRMZM2G025895	ähnlich zu WRKY Transkriptionsfaktor ( <i>A. thaliana</i> )	0.200	0.002
GRMZM2G030688	unbekanntes Protein	0.377	0.007
GRMZM2G037685	unbekanntes Protein	0.829	0.007

GRMZM2G050234	mögliche Oxidoreduktase-Aktivität	0.240	0.009
GRMZM2G076307	ähnlich zu Glycosyl-Transferase ( <i>O. sativa</i> )	0.239	0.006
GRMZM2G089231	unbekanntes Protein	0.527	0.004e-01
GRMZM2G114552	ähnlich zu Bowman-Birk Trypsin-Inhibitor ( <i>O. sativa</i> )	0.485	0.002
GRMZM2G119864	Pektinesterase	0.738	0.002
GRMZM2G121312	Polygalacturonase Inhibitor	0.528	2.888e-05
GRMZM2G149756	AP2-Domänen Transkriptionsfaktor	0.245	0.005
GRMZM2G339645	Cellulose Synthase	0.215	0.002e-01
GRMZM2G382379	Peroxidase Aktivität	0.503	0.006
GRMZM2G420870	unbekanntes Protein	0.498	8.275e-05
GRMZM2G425798	AP2-Domänen Transkriptionsfaktor	0.323	0.003
GRMZM5G879872	unbekanntes Protein	0.205	6.445e-05
GRMZM5G894016	$\beta$ -Ketoacyl-ACP-Synthase I	0.402	0.004
GRMZM5G898755	nicht-spezifisches Lipid-Transfer-Protein	0.336	0.002

#### Herunterregulierte Gene, die nur nach SG200-Infektionen induziert wurden

GRMZM2G000874	unbekanntes Protein	0.024	0.429
GRMZM2G083875	unbekanntes Protein	0.024	1,000
GRMZM2G336583	RNA-bindendes Protein	0.037	0.288

#### Herunterregulierte Gene, die nur nach SG200 $\Delta$ um11464-Infektionen induziert wurden

AC149829.2_FG003	Nucleoporin Autopeptidase	0.395	0.031
EF517601.1_FG014	unbekanntes Protein	0.338	0.044
GRMZM2G021303	ähnlich zu TPR-like Protein ( <i>A. thaliana</i> )	1,000	0.040
GRMZM2G054380	Histone-lysine N-methyltransferase	0.222	0.025
GRMZM2G086066	Metallionen-bindendes Protein	1,000	0.042
GRMZM2G089517	unbekanntes Protein	0.499	0.022
GRMZM2G092232	ähnlich zu Kinesinmotor-Domänen enthaltendes Protein ( <i>O. sativa</i> )	0.949	0.0168

GRMZM2G097618	unbekanntes Protein	0.485	0.002
GRMZM2G103740	Replikationsfaktor C 2	0.240	0.007
GRMZM2G164340	Nitrilase-assoziiertes Protein	0.895	0.046
GRMZM2G177165	Chromatin Komplex Untereinheit A101	0.300	0.047
GRMZM2G181081	CBL-interacting Proteinkinase	1,000	0.030
GRMZM2G325783	ähnlich zu Xklp2-targeting Protein ( <i>A. thaliana</i> )	0.445	0.036
GRMZM2G349193	ähnlich zu PPR-like Protein ( <i>O. sativa</i> )	1,000	0.011
GRMZM2G392918	unbekanntes Protein	0.237	0.011
GRMZM2G436344	ähnlich zu C2H2-type Zinkfinger Protein ( <i>A. thaliana</i> ; <i>O. sativa</i> )	0.276	0.033
GRMZM2G440831	unbekanntes Protein	0.638	0.021
GRMZM2G703442	ähnlich zu C2H2-type Zinkfinger Protein ( <i>A. thaliana</i> ; <i>O. sativa</i> )	0.255	0.043
GRMZM5G899787	ähnlich zu RRM-enhaltendes Protein ( <i>O. sativa</i> )	0.217	0.041

<sup>1</sup> Die Annotation wurde durch BLAST Analysen und unter <http://www.maizegdb.org> ermittelt

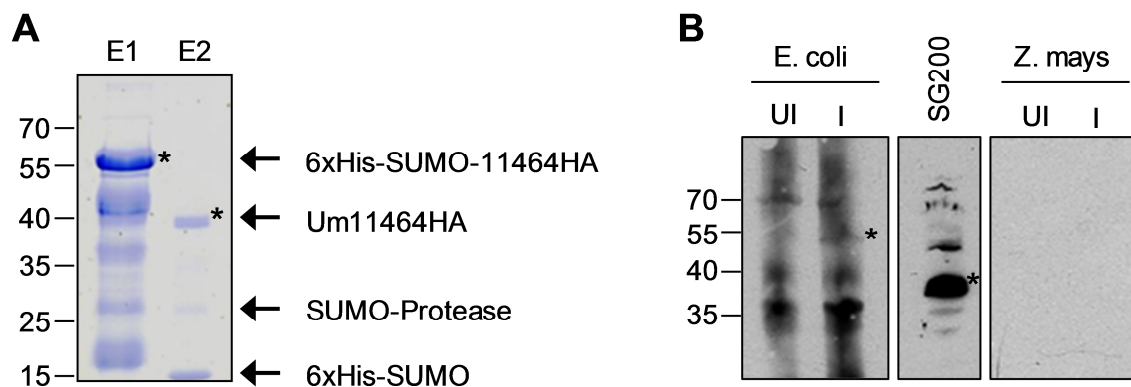
## 2.7 Heterologe Expression von Um11464

Um Um11464-Protein für biochemische Analysen zu gewinnen, wurde das prokaryotische Expressionssystem *E. coli* sowie die eukaryotischen Expressionssysteme *P. pastoris* und *N. benthamiana* getestet. Auch eine Überproduktion in *U. maydis* selbst wurde herangezogen, um Um11464 in ausreichendem Maße zu gewinnen. Im Folgenden werden jene Expressionssysteme näher erläutert, die der heterologen Synthese von Um11464 am dienlichsten waren.

### 2.7.1 Rekombinante Proteinsynthese in *E. coli* und Gewinnung polyklonaler Antikörper

Für die rekombinante Synthese von Um11464 in *E. coli* wurden zahlreiche Vektoren mit unterschiedlichsten Fusions-Tags (GST, Strep, His) sowie verschiedenste *E. coli* BL21-Derivate zur Expression herangezogen. Auch die Expressionsbedingungen wie Temperatur, Dauer und IPTG-Konzentration zur Induktion der Proteinexpression wurden

variiert, um eine Optimierung zu erzielen. Unter den gegebenen Expressionsbedingungen akkumulierte Um11464 jedoch stets in der unlöslichen Fraktion als Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*), so dass nach Aufreinigungsversuchen kein natives Protein in der löslichen Fraktion erhalten werden konnte (nicht gezeigt). Zur Gewinnung von Antikörpern wurde Um11464 daher unter denaturierenden Bedingungen durch Zugabe von 8 M Harnstoff aus „*inclusion bodies*“ solubilisiert. Hierzu wurde zunächst das *um11464* Gen ohne N-terminale Signalpeptidsequenz in den Vektor pET SUMO kloniert, was zu einer N-terminalen 6xHis-SUMO-Proteinfusion führte. Zusätzlich wurde *um11464* mit einem C-terminalen HA-Tag versehen, um eine anschließende Detektion in Western-Analysen zu erleichtern. Das ca. 50 kDa große Fusionsprotein wurde in dem *E. coli* Derivat BL21 (DE3)pLysS hergestellt und nach Zelllyse unter Zugabe von Harnstoff über Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Trotz vereinzelter Degradationsbanden konnte so eine ausreichende Proteinausbeute erzielt werden (Abb. 19A).



**Abb. 19: Heterologe Expression und Aufreinigung von Um11464 zur Gewinnung polyklonaler Antikörper.** **A:** Um11464 wurde als N-terminales 6xHis-SUMO-Fusionsprotein in *E. coli* BL21 (DE3)pLysS produziert. Die Expression erfolgte nach Zugabe von 1 mM IPTG für 18 Stunden bei 20°C. Das Fusionsprotein 6xHis-SUMO-11464HA wurde anschließend unter denaturierender Reinigung aus „*inclusion bodies*“ solubilisiert und konnte als ca. 50 kDa große Bande in Coomassie-gefärbten SDS-Gelen detektiert werden (E1, durch Sternchen gekennzeichnet). Zusätzlich wurde das Fusionsprotein einem SUMO-Protease-Verdau unterzogen (E2). Das erhaltene Protein Um11464HA (E2, durch Sternchen gekennzeichnet) wurde aus Coomassie-gefärbten SDS-Gelen ausgeschnitten und für die Antikörpergewinnung verwendet. Das 6xHis-SUMO-11464HA Fusionsprotein sowie die einzelnen Spaltprodukte nach SUMO-Protease-Verdau sind durch Pfeile markiert. Der Größenstandard (kDa) ist links gezeigt. **B:** Kreuzreaktion des polyklonalen anti-Um11464HA Antikörpers in Proteinextrakten von *E. coli* BL21 (DE3)pLysS, *U. maydis* SG200 und *Z. mays*. Die Expression von 6xHis-SUMO-11464HA in Proteinextrakten aus *E. coli* wurde entweder nicht induziert (UI) oder für vier Stunden mit 1 mM IPTG induziert (I). Die Proteinextrakte aus Mais stammen von uninfizierten (UI) oder mit SG200-infizierten (I) Pflanzen. Alle Proteinextrakte wurden in Western-Analysen mit dem aus Kaninchen gewonnenen polyklonalen anti-Um11464HA beprobt. Der Antikörper wurde dabei in einer Verdünnung von 1:10.000 eingesetzt. Die erwarteten Um11464-Fusionsproteine in den einzelnen Lysaten sind durch Sternchen gekennzeichnet. Der Größenstandard (kDa) ist links gezeigt.

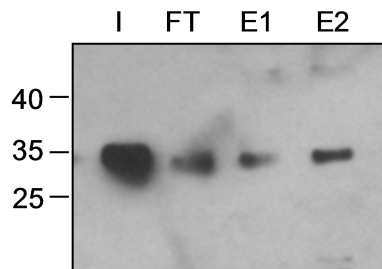
Da es sich bei dem SUMO Protein um ein Ubiquitin-ähnliches Protein handelt, welches in Eukaryoten zahlreich vertreten ist, war im Folgenden eine Abspaltung der 6xHis-SUMO-Fusion unentbehrlich, um das synthetisierte Protein für eine anschließende Immunisierung von Kaninchen zur Gewinnung polyklonaler Antikörper einzusetzen. Daher wurde das aufgereinigte Um11464-Fusionsprotein einem SUMO-Protease-Verdau unterzogen, um die N-terminale 6xHis-SUMO-Fusion zu entfernen. Danach war die SUMO-Protease, das 6xHis-SUMO-Spaltprodukt als auch das gewünschte Um11464HA-Fusionsprodukt im Coomassie-gefärbten SDS-Gel sichtbar (Abb. 19A). Letzteres wurde aus dem Gel ausgeschnitten und für die Immunisierung von Kaninchen eingesetzt (vgl. Kapitel 4.6.6.5). Das erhaltene anti-Um11464HA Serum aus Kaninchen wurde wiederum in Western-Analysen hinsichtlich der Reaktion und Spezifität zu Zelllysaten aus *E. coli*, *U. maydis* und *Z. mays* getestet. Dabei wurde der Antikörper in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Eine 1:10.000 Verdünnung war hierbei ausreichend, um eine Immunreaktion in SG200 auszulösen (Abb. 19B). Für Proteinextrakte aus *E. coli* erwies sich der Antikörper jedoch als unbrauchbar, da neben der Um11464-spezifischen Bande bei etwa 50 kDa, welche zudem recht schwach war, ein hohes Hintergrundsignal entstand (Abb. 19B). In Maisproteinextrakten wurde kein Um11464HA-Signal erhalten (Abb. 19B).

### 2.7.2 Rekombinante Proteinsynthese in *N. benthamiana*

Aufgrund der Tatsache, dass natives, rekombinantes Protein Um11464 nicht in *E.coli* produziert werden konnte und auch Expressionsversuche in *P. pastoris* und eine Um11464-Überproduktion in *U. maydis* selbst erfolglos blieben (nicht gezeigt), wurde im Folgenden auf das eukaryotische Expressionssystem *N. benthamiana* zurückgegriffen. Durch die Expression in dem eukaryotischen System sollten post-translationale Modifikationen und somit eine ausreichende Faltung und Funktionalität des Proteins sichergestellt werden.

Für die Proteinexpression wurde *um11464* mit einem N-terminalen *Strep*-Tag fusioniert und in den Vektor pBIN19AN kloniert. Nach Transformation in den *A. tumefaciens* Stamm GV3101 erfolgte eine *A. tumefaciens*-vermittelte, transiente Transformation in *N. benthamiana*. Das nach 5 Tagen in Tabak exprimierte, ca. 34 kDa große *Strep*-Um11464-Fusionsprotein wurde mittels *Strep*-Tag Affinitätschromatographie über eine *Strep*-Tactin Sepharose aufgereinigt und im SDS-Gel nach Coomassie-Färbung visualisiert (Abb. 20). An dieser Stelle muss jedoch erwähnt werden, dass *um11464* versehentlich ohne

Signalpeptid-Sequenz in den Vektor pBIN19AN kloniert wurde. Die Proteinexpression erfolgte demnach wieder ohne die Gewährleistung post-translationaler Modifikationen.

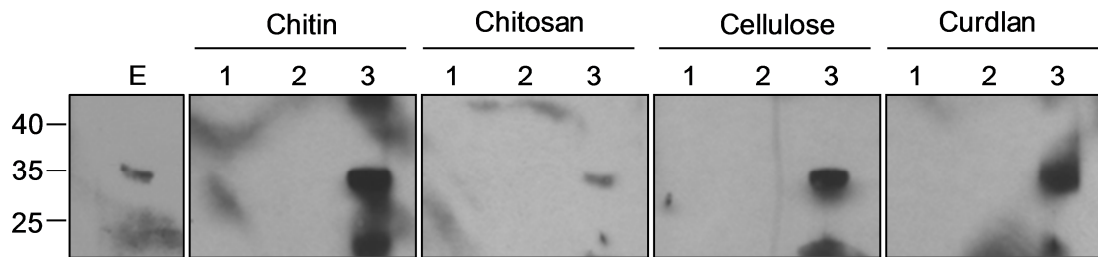


**Abb. 20: Heterologe Expression von Um11464 durch *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation in *N. benthamiana*.** *A. tumefaciens* wurde mit dem Strep-Um11464-Fusionskonstrukt transformiert und zur Infiltration von *N. benthamiana* verwendet. Fünf Tage nach Infiltration wurden die Blätter geerntet, lysiert und das Pflanzenlysat mittels Strep-tag Affinitätschromatographie aufgereinigt. Das 34 kDa große Strep-Um11464-Fusionsprotein konnte danach in Western-Analysen mit Strep-Taktin-HRP in den einzelnen Fraktionen detektiert werden. L: Lysat; FT: Flow-through; E1: Elution 1; E2: Elution 2. Der Größenstandard (kDa) ist links gezeigt.

### 2.7.3 Heterolog exprimiertes Um11464 Protein interagiert nicht mit Polysacchariden

Das in *N. benthamiana* produzierte Strep-Um11464-Fusionsprotein wurde für Polysaccharid-Bindeversuche eingesetzt. Da Um11464 zwei LysM-Domänen besitzt, lag die Vermutung nahe, dass es, typisch für LysM-Proteine, eine hohe Affinität zu diversen Polysacchariden aufweisen sollte (Andre *et al.*, 2008; de Jonge *et al.*, 2010; Petutschnig *et al.*, 2010). Aufgereinigtes Protein wurde daher nach van den Burg *et al.* (2006) mit leichten Modifikationen (vgl. Kapitel 4.6.7) mit den unlöslichen Polysacchariden Chitin, Chitosan, Curdlan ( $\beta$ -1,3 Glucan), Cellulose, Pektin und Xylan inkubiert und nach zentrifugaler Trennung in lösliche (Überstand) und unlösliche Fraktion (Polysaccharide) in Western-Analysen mittels Strep Taktin-HRP detektiert. Dabei zeigte sich, dass Strep-Um11464 mit keinem der getesteten Polysaccharide co-präzipitierte (Abb. 21). Dies steht im Gegensatz zu bereits veröffentlichten Studien über LysM-Proteine phytopathogener Pilze, welche die pilzlichen Zellwandbestandteile wie Chitin oder Chitosan abfangen, um so die Erkennung durch die Pflanze und die damit einhergehende Pflanzenabwehr zu unterbinden (de Jonge *et al.*, 2010).





**Abb. 21: Polysaccharid-Bindeversuche mit aufgereinigtem Um11464.** Die Polysaccharid-Bindeversuche wurden nach van den Burg *et al.* (2006) durchgeführt, wobei leichte Abweichungen vom Protokoll vorgenommen wurden (vgl. Kapitel 4.6.7). Das aus Tabak gewonnene, aufgereinigte Fusionsprotein Strep-Um11464 (E) wurde mit den unlöslichen Polysacchariden Chitin, Chitosan, Cellulose und Curdlan für 4 h bei 4°C inkubiert und der Reaktionsansatz durch Zentrifugation in die unlösliche Pellet und lösliche Überstandsfraktion separiert. Die unlösliche Fraktion wurde erst mit 1% SDS (2), danach in 5x SDS-Gelladepuffer (1) gekocht und zusammen mit der löslichen, TCA-gefällten Überstandsfraktion (3) in Western-Analysen mit Strep-Taktin-HRP untersucht. Der Größenstandard (kDa) ist links gezeigt.

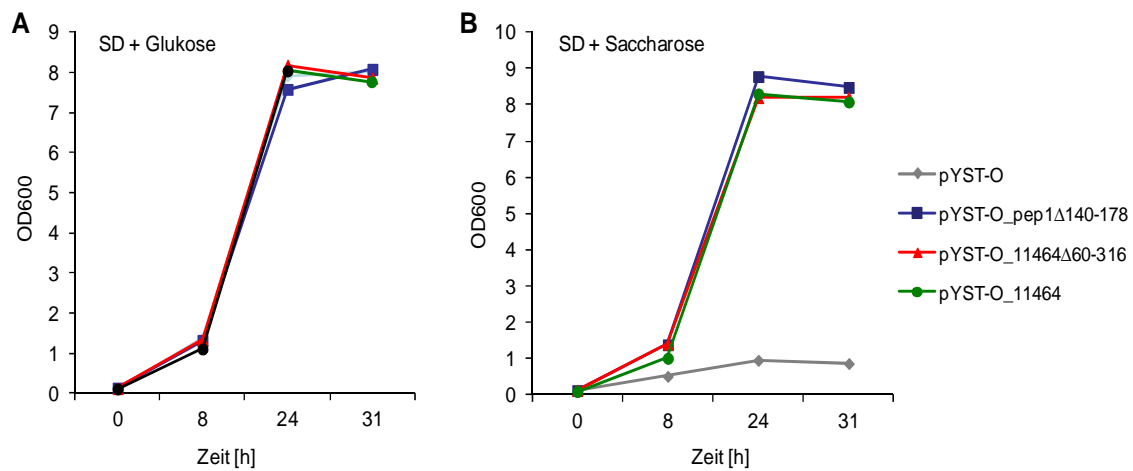
## 2.8 Lokalisationsstudien zu Um11464

Bioinformatische Analysen ergaben, dass Um11464 mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit über den kanonischen Weg durch das Endoplasmatische Retikulum (ER) und Golgi Apparat sekretiert wird. Dies soll nun im Folgenden experimentell belegt werden.

### 2.8.1 Verifizierung der Funktionalität des N-terminalen Signalpeptids von Um11464

Zur Überprüfung, ob das Um11464 Signalpeptid eine effiziente Proteinsekretion ermöglicht, wurde auf das für *S. cerevisiae* etablierte System der Hefesignalsequenzfalle (YSST) zurückgegriffen (Catanzariti *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006). Hierbei bedient man sich eines Invertase-defizienten Hefestammes, der aufgrund fehlender Zuckertransporter für Di- und Trisaccharide nicht auf Minimalmedium mit Saccharose wachsen kann. Er benötigt demnach eine sekretierte Invertase zur Spaltung der Saccharose in Fruktose und Glukose, was durch Transformation mit dem Plasmid pYST-O erreicht werden kann. Dieses codiert für eine sekretierte Invertase (SUC2), der jedoch für die Expression das Startcodon und das Signalpeptid fehlen. Eine Komplementation der Invertasedefizienz ist demnach nur möglich, wenn vor die Invertasesequenz ein DNA-Abschnitt mit den geforderten Funktionen *in frame* kloniert wird. Im Falle von *um11464* wurden die Sequenz des Volllänge-Gens (pYST-O\_um11464) sowie eine verkürzte Version (pYST-O\_um11464<sup>Δ60-316</sup>) inseriert. Als Positivkontrolle diente eine verkürzte Genversion von *pep1* (pYST-O\_pep1<sup>Δ140-178</sup>), welches für ein bereits bekanntes, sekretiertes Protein in *U.*

*maydis* codiert (Doehlemann *et al.*, 2009). Die Transformation mit dem Leervektor pYST-O diente als Negativkontrolle.

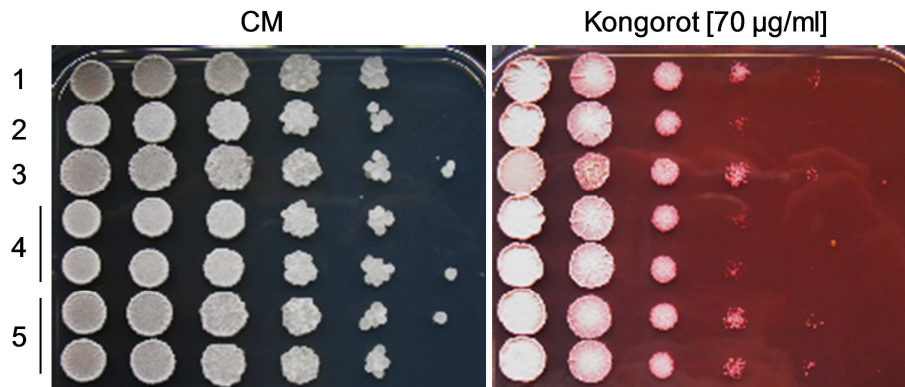


**Abb. 22: Signalpeptid-Funktionalität von Um11464 über die Hefesignalsequenzfalle (YSST).** Der Invertase-defiziente Hefestamm Y02321 wurde mit dem Leervektorplasmid pYST-O bzw. den Plasmiden pYST-O<sub>um11464</sub>, pYST-O<sub>um11464</sub><sup>Δ60-316</sup> und pYST-O<sub>pep1</sub><sup>Δ140-178</sup> zur Komplementation der Invertase-Expression transformiert. **A:** Die jeweiligen Hefetransformanten wurden in Glukose-haltigem Kontrollmedium kultiviert und die Zelldichte zu unterschiedlichen Zeiten des Wachstums photometrisch bestimmt. **B:** Die jeweiligen Hefetransformanten wurden in Saccharose-haltigem Minimalmedium kultiviert und die Zelldichte wie in A beschrieben bestimmt.

Wachstumsanalysen der jeweiligen Hefetransformanten zeigten eine vergleichbare Wachstumsrate aller Stämme in Glukose-haltigem Kontrollmedium (Abb. 22A). In Saccharose-haltigem Medium hingegen waren nur jene Hefestämme zum Wachstum befähigt, in denen der Invertase-ORF durch die verkürzten und Volllänge-Gensequenzen von *um11464* und *pep1* ergänzt wurden (Abb. 22B). Das Um11464 Signalpeptid ist demnach funktionell und sollte eine effiziente Sekretion des Proteins über den kanonischen Weg ermöglichen.

Um herauszufinden, ob das Signalpeptid wichtig ist für die Funktion von Um11464, wurden im weiteren Verlauf Deletions- und Komplementationsanalysen durchgeführt. Hierzu wurde das Signalpeptid von Um11464 im Stamm SG200Δum11464-11464<sup>Δ1-21</sup> deletiert oder aber durch das Signalpeptid des sekretierten Proteins CmuI (Djamei *et al.*, 2011) im Stamm SG200Δum11464-11464<sup>Δ1-21</sup>-SP<sub>cmuI</sub> substituiert. Die generierten Stämme wurden zusammen mit dem Referenzstamm SG200, der Deletionsmutante SG200Δum11464 sowie dem Komplementationsstamm SG200Δum11464-11464HA hinsichtlich ihres Wachstums auf dem Zellwandstressor Kongorot getestet (vgl. Kapitel 2.3.3). Es war zu beobachten, dass lediglich die Stämme wuchsen, welche Um11464 mit

dem eigenen oder dem Signalpeptid von CmuI exprimierten (Abb. 23). Eine Deletion des Um11464 Signalpeptids resultierte in einem zur *um11464* Deletionsmutante vergleichbaren Wachstumsdefekt auf dem getesteten Stressor (Abb. 23). Dies zeigt, dass ein funktionelles Signalpeptid Voraussetzung für die Funktionalität des Um11464 Proteins ist.

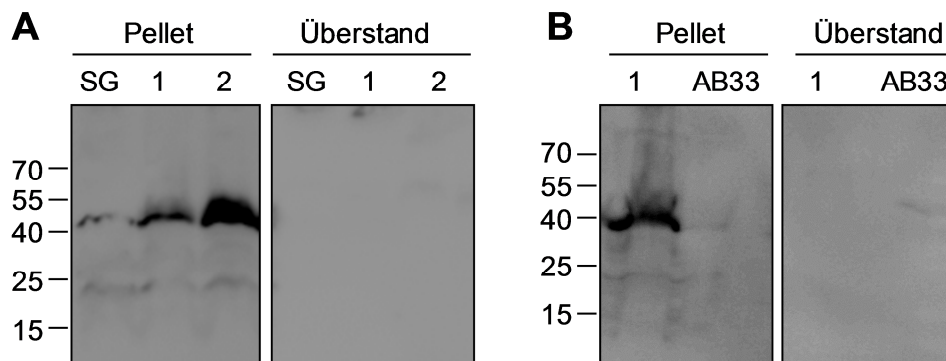


**Abb. 23: Ein funktionelles Signalpeptid ist Voraussetzung für die Funktion von Um11464.** Serielle Verdünnungen der Stämme SG200 (1), SG200Δum11464 (2), SG200Δum11464-11464HA (3) sowie zwei unabhängigen Stämmen von SG200Δum11464-11464<sup>Δ1-21</sup> (4) und SG200Δum11464-11464<sup>Δ1-21</sup>-SP<sub>CmuI</sub> (5) wurden auf CM-Medium mit oder ohne Stressor getropft und für drei Tage bei 28°C inkubiert. Wachstumsdefekte deuten eine Sensitivität an.

## 2.8.2 Analyse der Um11464 Sekretion in Sporidien und b-abhängigen Filamenten

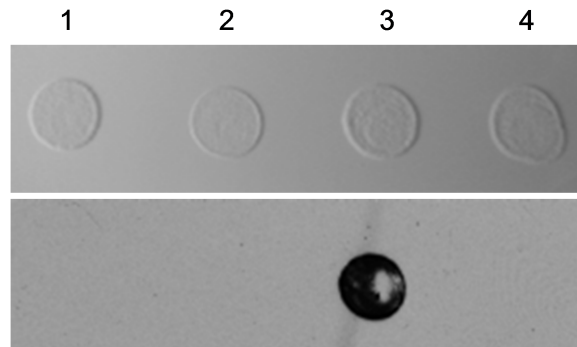
Zur Analyse der Um11464 Sekretion in axenischer Kultur wurden Stämme generiert, in denen *um11464* mit einem C-terminalen HA-Tag und unter Kontrolle des nativen Promotors bzw. des starken *otef* Promotors in den *ip*-Lokus des Deletionsstammes SG200Δum11464 integriert wurde. Zusätzlich wurde das Um11464-HA Fusionsprotein in dem haploiden FB2-Derivat AB33 exprimiert, bei welchem die Bildung b-abhängiger Filamente durch Aktivierung des Nitrat-induzierbaren *nar* Promotors in Nitratminimalmedium induziert werden kann (Brachmann *et al.*, 2001). AB33-Filamente des Stammes AB33-um11464HA als auch Sporidien der jeweiligen SG200-Stämme (SG200Δum11464-11464HA bzw. SG200Δum11464-P<sub>otef</sub>11464HA) wurden durch Zentrifugation vom Kulturüberstand separiert. In den Überstand sekretierte Proteine wurden durch TCA-Präzipitation stark ankonzentriert. Zellpellet- und Überstandsfraktion wurden anschließend hinsichtlich der Um11464 Sekretion unter Verwendung HA-spezifischer Antikörper in Western-Analysen untersucht. Dabei fiel auf, dass Um11464 weder im Kulturüberstand haploider Sporidien, noch im Kulturüberstand b-abhängiger

AB33-Filamente detektiert werden konnte (Abb. 24A und B). Auch die Expression unter Kontrolle des starken, konstitutiven *otef* Promotors ließ keine Detektion des sekretierten Um11464HA-Proteins zu (nicht gezeigt). In den Zellpelletfraktionen hingegen konnte Um11464 abhängig davon, wie oft es in den *ip*-Lokus des jeweiligen Referenzstammes integriert wurde, als unterschiedlich starke Bande nachgewiesen werden (Abb. 24A und B). Jedoch fiel auf, dass die detektierte Bande von etwa 42 kDa die vorhergesagte Proteinmasse von 36 kDa leicht übertraf (Abb. 24). Es ist demnach anzunehmen, dass das Um11464-HA-Fusionsprotein post-translationale Modifikationen besitzt.



**Abb. 24: Western-Analysen zum Nachweis von Um11464 in Zellpellet- und Kulturüberständen.** **A:** Sporidien von SG200 (SG) und zwei unabhängigen SG200Δum11464-11464HA Stämmen mit entweder Einfach- (1) bzw. Mehrfachkopie (2) von *um11464* im *ip*-Lokus des Deletionsstammes SG200Δum11464 wurden während der exponentiellen Wachstumsphase in YEPS<sub>L</sub> durch Zentrifugation in Zellpellet- und Kulturüberstand separiert. Nach TCA-Fällung des Kulturüberstandes (vgl. Kapitel 4.6.3) wurden beide Fraktionen unter Verwendung HA-spezifischer Antikörper in Western-Analysen hinsichtlich der Um11464 Sekretion untersucht. Der Größenstandard (kDa) ist links angegeben. **B:** Nach 5-stündiger Induktion des filamentösen Wachstums von AB33 und AB33-um11464HA (1) durch den Wechsel von Ammonium- zu Nitratminimalmedium wurden die Zellen wie in A beschrieben vom Kulturüberstand getrennt und für Western-Analysen mit HA-spezifischen Antikörpern eingesetzt. Der Größenstandard (kDa) ist links angegeben.

Um die Sekretion von Um11464 weitergehend zu analysieren, wurde ein Kolonie-Sekretionstest durchgeführt. Hierzu wurden Zellen in YEPS<sub>L</sub> kultiviert und nach dem Auftropfen auf eine Nitrozellulosemembran über Nacht bei 28°C inkubiert. Sekretierte Proteine, welche auf die Membran übergegangen sind, wurden über HA-spezifische Antikörper detektiert. Es war zu beobachten, dass selbst unter Verwendung des stark konstitutiven *otef* Promotors keine Um11464 Sekretion detektierbar war (Abb. 25). Sekretion aufgrund von Zelllyse wurde durch einen Kontrollstamm, welcher cytoplasmatisches *mcherryHA* exprimiert, ausgeschlossen (Abb. 25). Der Stamm SG200-*P<sub>otef</sub>*-*msb2HA* hingegen diente als Positivkontrolle und zeigte ein deutliches Signal aufgrund der *Msb2* Sekretion (Abb. 25).

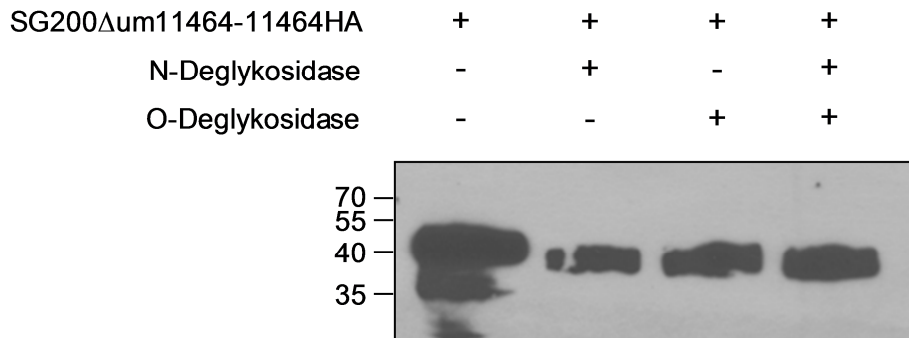


**Abb. 25: Kolonie-Sekretionstest.** Zellsuspensionen von SG200 (1), SG200 $\Delta$ um11464-P<sub>otef</sub>11464HA (2), SG200-P<sub>otef</sub>msb2HA (3) und SG200-P<sub>otef</sub>mCherryHA (4) wurden nach Kultivierung in YEPS<sub>L</sub> auf eine Nitrozellulosemembran getropft und über Nacht bei 28°C inkubiert (oben). Sekretierte Proteine wurden nach Entfernung der Kolonien mittels HA-spezifischer Antikörper nachgewiesen (unten).

### 2.8.3 Untersuchungen zur Modifikation von Um11464

Sekretierte Proteine werden auf ihrem Weg in den Extrazellularraum zumeist post-translational durch das Anhängen einer oder mehrerer, kovalent gebundener Kohlenhydratketten modifiziert. Dies geschieht entweder N-glykosidisch im Endoplasmatischen Retikulum oder O-glykosidisch im Golgi-Apparat. Danach werden sie als Glykoproteine bezeichnet.

Da laut bioinformatischer Analyse drei putative N-Glykosylierungsstellen in der Proteinsequenz von Um11464 vorhergesagt wurden (vgl. Kapitel 2.1), sollte im Folgenden untersucht werden, ob das Um11464-HA-Fusionsprotein nach Deglykosylierung im SDS-Gel bei niedrigerer Molekularmasse migriert. Dazu wurden Sporidien des Stammes SG200 $\Delta$ um11464-11464HA während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und das Zelllysate mit der N-Deglykosidase PNGase F, der O-Deglykosidase Endo- $\alpha$ -N-Acetylgalactosaminidase sowie beiden Deglykosidase-Typen gleichzeitig behandelt. Es zeigte sich nach allen drei Behandlungen eine verringerte Molekularmasse im Vergleich zum nicht-deglykosylierten Protein Um11464 (Abb. 26). Allerdings wurde die vorhergesagte Proteinmasse von 36 kDa nicht erreicht, auch wenn beide Deglykosidasen gleichzeitig eingesetzt wurden (Abb. 26). Dies bedeutet, dass Um11464 entweder ein unnormales Laufverhalten in SDS-Gelen aufweist oder aber weitere post-translationale Modifikationen trägt.

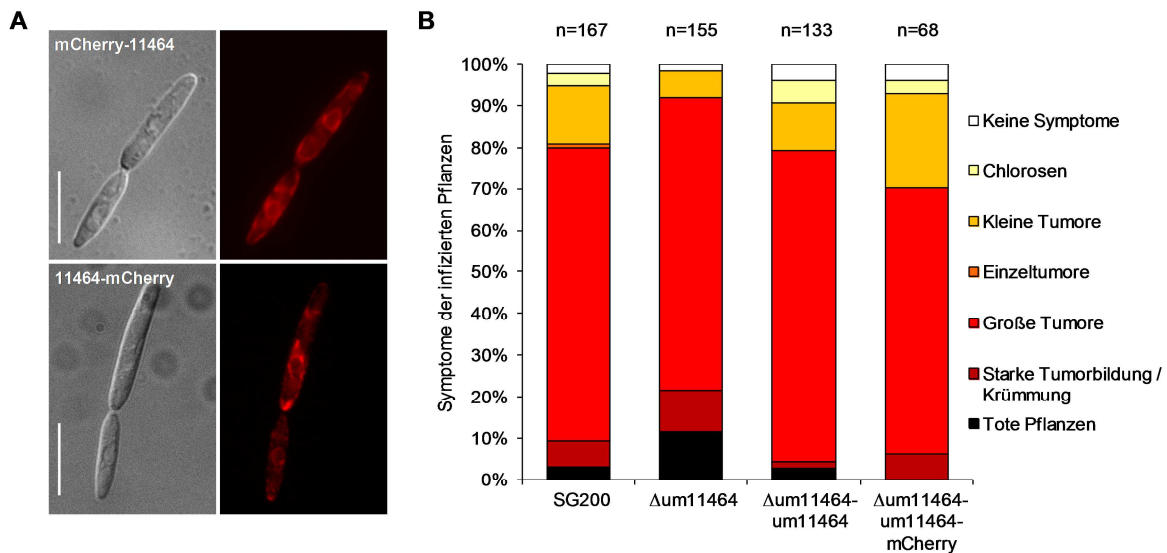


**Abb. 26: Nachweis N- und O-glykosidischer Modifikationen von Um11464.** SG200Δum11464-11464HA wurde während der exponentiellen Wachstumsphase in YEPS<sub>L</sub> geerntet und das Zelllysate mit der N-Deglykosidase PNGase F, der O-Deglykosidase Endo-α-N-Acetylgalactosaminidase sowie beiden Deglykosidase-Typen gleichzeitig behandelt. Die Detektion nicht-deglykosilierten und deglykosilierten Proteins erfolgte mittels Western-Analyse unter Verwendung HA-spezifischer Antikörper. Der Größenstandard (kDa) ist links angegeben.

## 2.8.4 Um11464 lokalisiert in der pilzlichen Zellwand

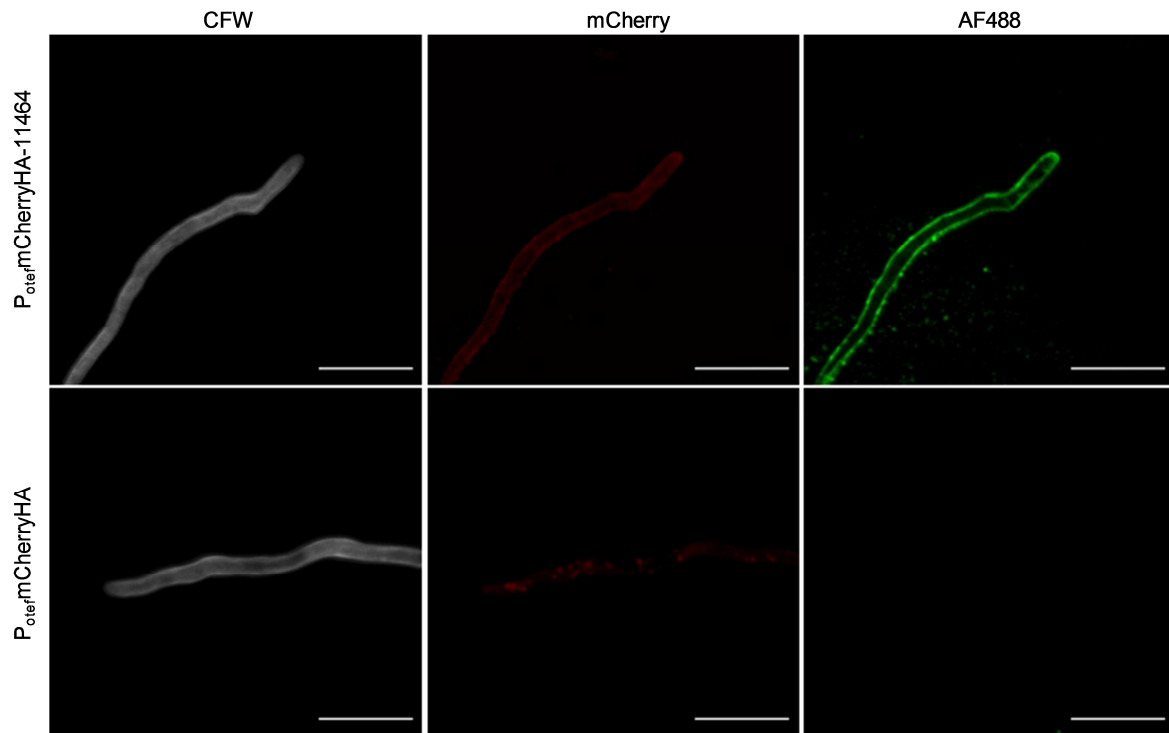
Die bisherigen Ergebnisse hinsichtlich der Um11464 Lokalisation ließen keinen Rückschluss auf eine eventuelle Sekretion des Proteins in den Kulturüberstand zu, obwohl das Signalpeptid von Um11464 experimentell als funktional eingestuft werden konnte (vgl. Kapitel 2.8.1). Aufgrund dessen wurden im Folgenden mCherry-Fusionen generiert, um Um11464 durch Fluoreszenzmikroskopie zu lokalisieren. Es wurden N- und C-terminale Um11464-mCherryHA-Fusionen erstellt und unter Kontrolle des nativen Promotors sowie zur Erhöhung der Expression unter Kontrolle des stark konstitutiv exprimierten *otef* Promotors in einfacher Kopienzahl in den *ip*-Lokus des Stammes SG200Δum11464 integriert. Die Stämme, welche die Fusionsproteine unter Kontrolle des *otef* Promotors exprimierten, wurden für mikroskopische Analysen verwendet. Dabei zeigte sich, dass Um11464-mCherryHA und mCherryHA-Um11464 sowohl in Sporidien als auch in Hyphen (nicht gezeigt) in zellulären Strukturen lokalisierte, die dem pilzlichen ER entsprechen könnten (Abb. 27A). Die Stämme, welche die Fusionsproteine unter Kontrolle des nativen Promotors exprimierten, wurden für Pflanzeninfektionen verwendet. Hierbei wurde getestet, ob die generierten Fusionsproteine in der Lage sind, den hypervirulenten Phänotyp der *um11464* Deletionsmutante zu komplementieren. Am Beispiel des Stammes SG200Δum11464-um11464mCherryHA wird gezeigt, dass eine Komplementation der Hypervirulenz möglich ist, das heißt, die Symptomatik des Referenzstammes SG200 kann wieder hergestellt werden. (Abb. 27B). Somit dürfte die C-terminale Um11464-mCherryHA-Fusion ein funktionelles Protein ergeben haben.





**Abb. 27: Lokalisierung von Um11464 in haploiden Sporidien.** **A:** N- und C-terminale Um11464-mCherryHA-Fusion unter Kontrolle des stark konstitutiv exprimierten *otef* Promotors. Sporidien der Stämme SG200 $\Delta$ um11464-*P<sub>otef</sub>*mCherryHA-11464 und SG200 $\Delta$ um11464-*P<sub>otef</sub>*11464mCherryHA wurden während der exponentiellen Wachstumsphase in YEPS<sub>L</sub> geerntet, in Wasser auf OD 1,0 aufgenommen und mikroskopisch analysiert. Die Fluoreszenzsignale der N- und C-terminalen mCherryHA-Fusionen sind rechts abgebildet. Die entsprechende DIC-Durchlichtaufnahme ist links gezeigt. Der Längenmaßstab beträgt 10  $\mu$ m. **B:** Virulenz des Stammes SG200 $\Delta$ um11464-11464mCherryHA. Zellsuspensionen der angegebenen Stämme wurden mittels Spritzinfektion in sieben Tage alte Maispflanzen injiziert. Pflanzensymptome wurden zwölf Tage nach Infektion quantifiziert. Die Werte von drei bzw. im Falle des Stammes SG200 $\Delta$ um11464-11464mCherryHA nur zwei biologischen Replikaten wurden gemittelt und prozentual zur Gesamtzahl der infizierten Pflanzen (n) dargestellt.

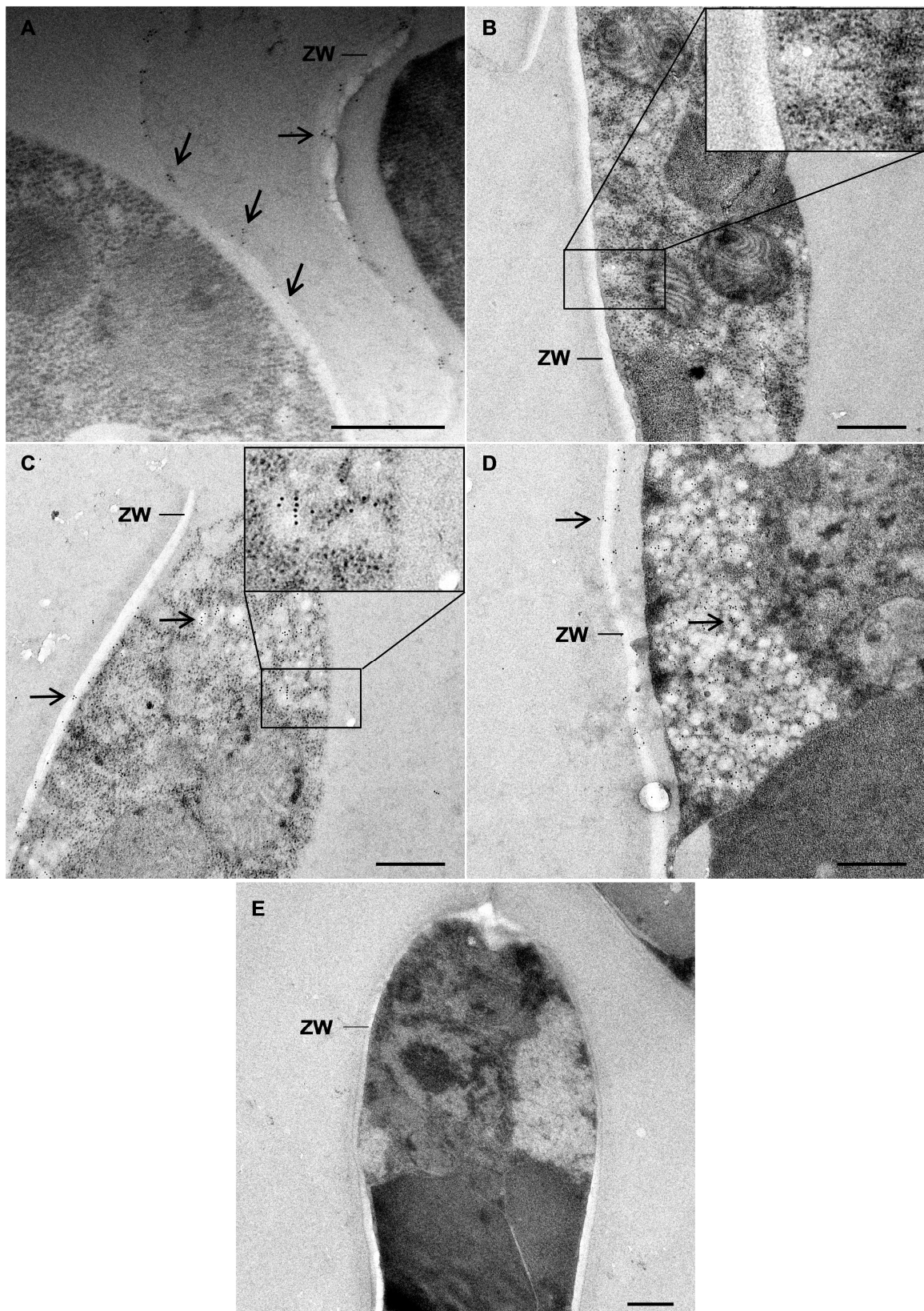
Die Lokalisierungsstudien von Um11464 wurden im Folgenden durch Immunfluoreszenzmikroskopie von *in vitro* generierten Filamenten ergänzt (vgl. Kapitel 4.7.4). Hierzu wurde nach Banuett und Herskowitz (2002) vorgegangen, wobei leichte Abwandlungen vom Protokoll getätigt wurden (vgl. Kapitel 4.7.4). Der Stamm SG200 $\Delta$ um11464-*P<sub>otef</sub>*mCherryHA11464, welcher *um11464* als N-terminale mCherryHA-Fusion unter Kontrolle des konstitutiven *otef* Promotors exprimierte, wurde zur Filamentbildung auf Parafilm gesprüht und nach Inkubation über Nacht bei 28°C mit primären anti-HA und sekundären, AF488-gekoppelten Antikörper behandelt. Es zeigte sich ein AF488-Fluoreszenzsignal in der Zellperipherie der Hyphen (Abb. 28). Zusätzlich wurde im mCherry-Kanal ein Signal innerhalb der Hyphenzelle detektiert (Abb. 28). Als Kontrolle für eine unspezifische Bindung sowie als Beleg der Membranimpermeabilität des sekundären Antikörpers wurde der Stamm SG200-*P<sub>otef</sub>*mcherryHA hinzugezogen, welcher cytoplasmatisches *mcherry*HA exprimiert. In diesem Fall war kein AF488-Signal detektierbar (Abb. 28).



**Abb. 28: Immunfluoreszenzmikroskopie zur Lokalisierung von Um11464 in Filamenten.** Die Stämme SG200 $\Delta$ um11464- $P_{oterf}$ mCherryHA-11464 und SG200- $P_{oterf}$ mCherryHA wurden in YEPS<sub>L</sub> kultiviert, in 2% YEPS<sub>L</sub> zu einer OD von 0,2 aufgenommen und mittels Sprüh-Inokulation auf Parafilm gesprüht. Die Filamente wurden ohne vorherige Permeabilisation der Plasmamembran mit primärem anti-HA sowie sekundärem, AF488-gekoppeltem Antikörper markiert. Zusätzlich zur Immunfluoreszenz wurde eine Calcofluor White-Färbung vorgenommen (links). Der Längenmaßstab beträgt 7,5  $\mu$ m.

Die fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich bei Um11464 um ein sekretiertes Protein handelt, was in der Zellperipherie akkumuliert und von außen für den Antikörper zugänglich ist. Zur genaueren Differenzierung, ob es sich hierbei um eine Plasmamembran- oder Zellwandlokalisierung handelt, wurde eine Immunmarkierung mit anschließender Elektronenmikroskopie vorgenommen. Dies wurde in Kooperation mit Dr. Andreas Klingl durchgeführt. Hierzu wurden Sporidien von SG200, SG200 $\Delta$ um11464, SG200 $\Delta$ um11464-11464HA sowie des Überexpressionsstammes SG200 $\Delta$ um11464- $P_{oma}$ 11464StrepHA unter hohem Druck gefroren und kryofixiert. Anschließend wurde eine Gefrierbruch/Gefrierätzung nach Klingl *et al.* (2011) vorgenommen und die Probe mit primärem anti-Um11464 (vgl. Kapitel 2.7.1) sowie sekundärem, Gold-gekoppeltem anti-Kanichen Antikörper inkubiert. Um11464 konnte daraufhin in der pilzlichen Zellwand, welche sich durch die Präparationsmethode teilweise von der Pilzzelle abgelöst hatte, detektiert werden (Abb. 29A, C, D).

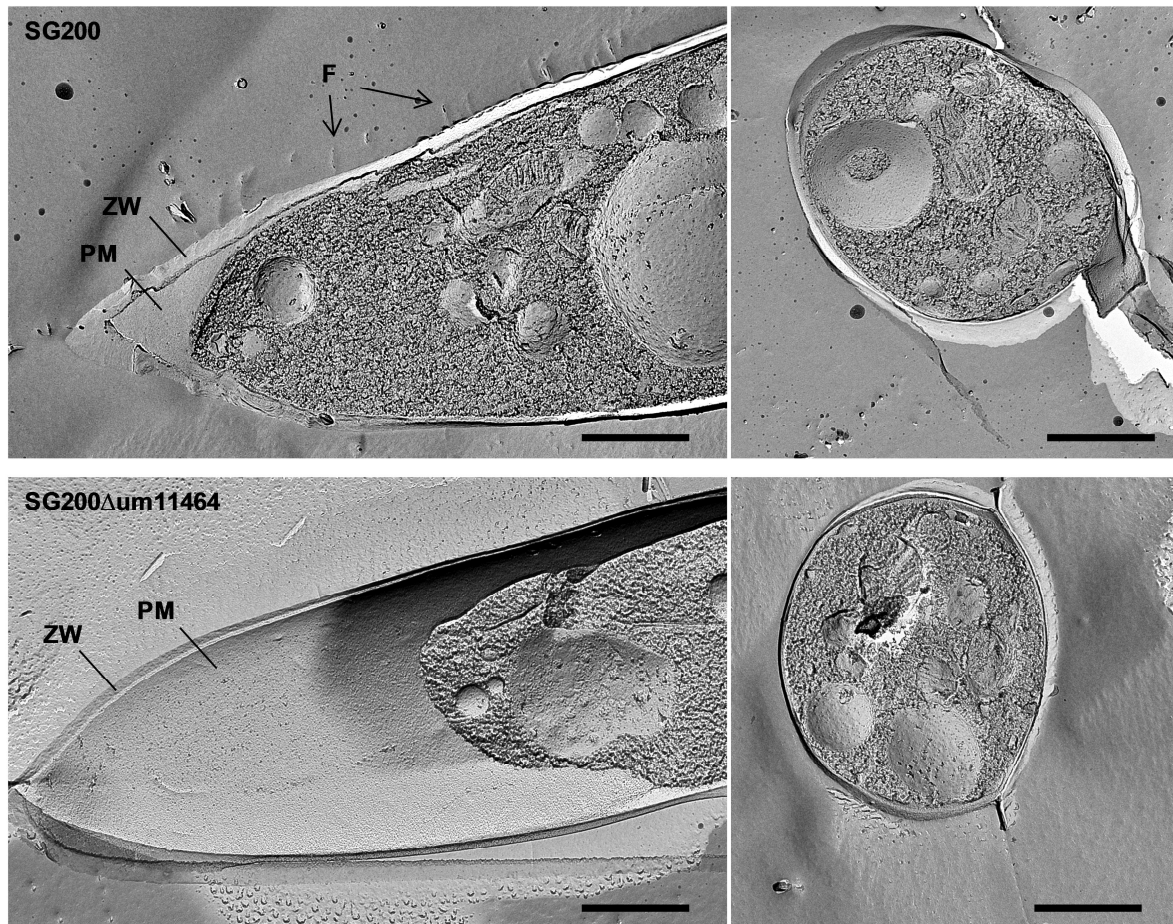




**Abb. 29: Immunmarkierung von Um11464 in Sporidien.** Sporidien von SG200 (A), SG200 $\Delta$ um11464 (B), SG200 $\Delta$ um11464-11464HA (C) und SG200 $\Delta$ um11464-P<sub>oma</sub>11464StrepHA (D) wurden hochdruckgefroren, kryofixiert und einer Gefrierbruch/Gefrierätzung unterzogen. Anschließend wurde mit primärem anti-Um11464 Antikörper sowie sekundärem, Gold-gekoppeltem anti-Kaninchen beprobt und die fertigen Präparate mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop (JEOL JEM 2100, Tokyo) untersucht. Eine Inkubation der Proben nur mit sekundärem anti-Kaninchen Antikörper wies keine Goldmarkierung auf und schließt eine Unspezifität des sekundären, Gold-gekoppelten Antikörpers aus. Der Längenmaßstab entspricht 500 nm. Pfeile kennzeichnen die 10 nm großen Goldpartikel im ER und der Zellwand. Die vergrößerten Ausschnitte in B und C dienen der Differenzierung zwischen Ribosomen bzw. Goldpartikeln. ZW: pilzliche Zellwand

Neben der Zellwand wurden Goldpartikel zusätzlich im ER vorgefunden (Abb. 29A, C, D). Diese Lokalisation verstärkte sich aufgrund der Überexpression von *um11464* im Stamm SG200 $\Delta$ um11464-P<sub>oma</sub>11464StrepHA (Abb. 29D), da dies anscheinend zu einer Akkumulation des Proteins im ER führte. Die *um11464* Deletionsmutante wiederum, welche das Epitop nicht besitzt, zeigte keine Goldmarkierungen (Abb. 29B). Wie in der Vergrößerung deutlich wird, handelt es sich bei den zu beobachtenden Strukturen um Ribosomen (siehe Abb. 29B), welche aufgrund ihrer schwächeren Kontrastierung deutlich von den 10 nm großen Goldpartikeln (siehe Abb. 29C) zu unterscheiden sind (A. Klingl, pers. Mitteilung). Eine Unspezifität des sekundären Antikörpers konnte durch die Inkubation der Proben mit sekundärem, Gold-gekoppeltem anti-Kaninchen Antikörper ausgeschlossen werden, denn auch hierbei wurde keine Goldmarkierung detektiert (Abb. 29E).

Parallel zur Immunmarkierung wurden elektronenmikroskopische Oberflächenaufnahmen der *um11464* Mutante durchgeführt. Hierzu wurden Sporidien aus der exponentiellen Wachstumsphase nach Kultivierung in YEPS<sub>L</sub> unter hohem Druck gefroren und kryofixiert. Durch Gefrierbruch / Gefrierätzung wurde die rasch gefrorene Probe entlang von Schwachstellen gebrochen und somit innere Zell- sowie Oberflächenstrukturen exponiert (Abb. 30). Dabei fielen Unterschiede in der Zellwandstruktur zwischen SG200 und SG200 $\Delta$ um11464 auf. Mithilfe eines Messtools der Kamerasoftware wurde die Zellwanddicke von mehr als 10 Sporidien beider Stämme gemessen. Die Messungen ergaben, dass die Zellwand der *um11464* Deletionsmutante mit 40 – 55 nm dicker ausfällt als die des Referenzstammes SG200 mit 30 – 45 nm (nicht gezeigt).

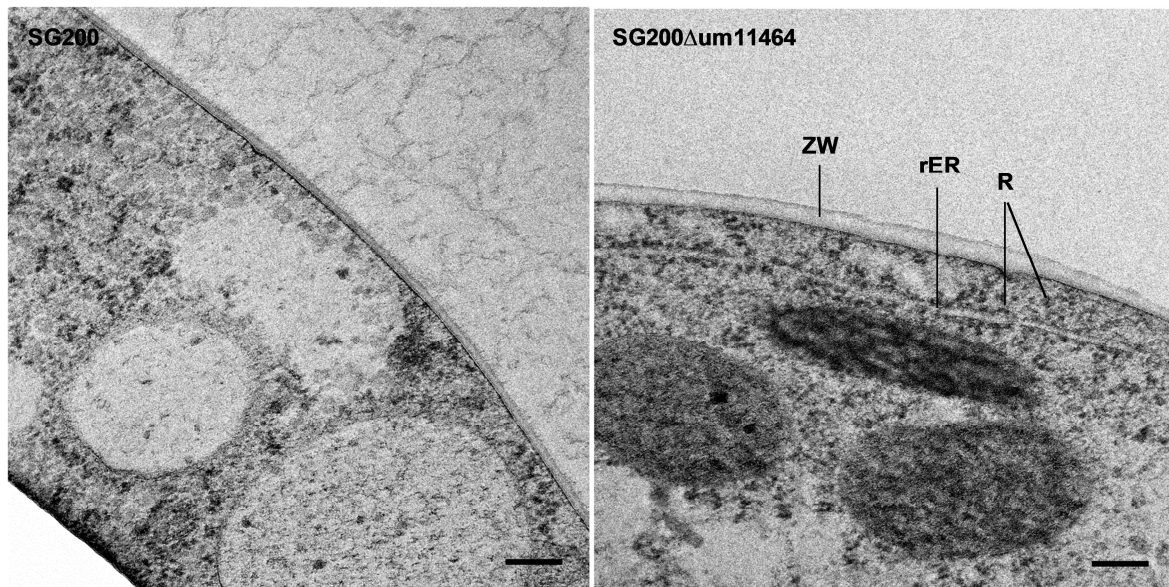


**Abb. 30: Oberflächen-Strukturaufnahmen haploider Sporidien von SG200 und SG200 $\Delta$ um11464.** Sporidien von SG200 und SG200 $\Delta$ um11464 wurden einer Gefrierbruch/Gefrierätzung unterzogen. Die fertigen Präparate wurden mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop (JEOL JEM 2100, Tokyo) untersucht. Die Bildaufnahme erfolgte mittels einer 2k x 2k CCD-Kamera F214 in Kombination mit der EM-Menu 4 Software (TVIPS, Gauting). Mit Hilfe eines Messtools dieser Software konnte die Dicke der Zellwand ermittelt werden. Der Größenmaßstab beträgt 1  $\mu$ m. ZW: pilzliche Zellwand; PM: Plasmamembran; F: Fimbrien

Auch Ultradünnschnitte kryofixierter Zellen ließen die veränderte Zellwandstruktur erkennen (Abb. 31). Zudem wirkte die Zellwand des *um11464* Deletionsstammes weniger dicht bepackt als die von SG200, was an der schwächeren Kontrastierung der Zellwand deutlich wird (Abb. 31). Bei genauerer Betrachtung der Zelloberfläche des Referenzstammes SG200 fiel zudem auf, dass diese dünne, fädige Strukturen aufweist (Abb. 30/31). Dieses könnten sogenannte „Fibrillen“ oder „Fimbrien“ sein, welche bereits in früheren Studien als Glykoproteine mit Funktion in Konjugation (Gardiner *et al.*, 1982) bzw. Adhäsion (Müller *et al.*, 2008; Wessels, 1996) diskutiert wurden. Während von 27 Sporidien des Referenzstammes SG200 insgesamt 13 Sporidien Fimbrien zeigten, konnten solche Strukturen im *um11464* Deletionsstamm nicht beobachtet werden. Dies lässt



vermuten, dass Um11464 einen signifikanten Einfluss auf die Oberflächenbeschaffenheit haploider Sporidien nimmt.

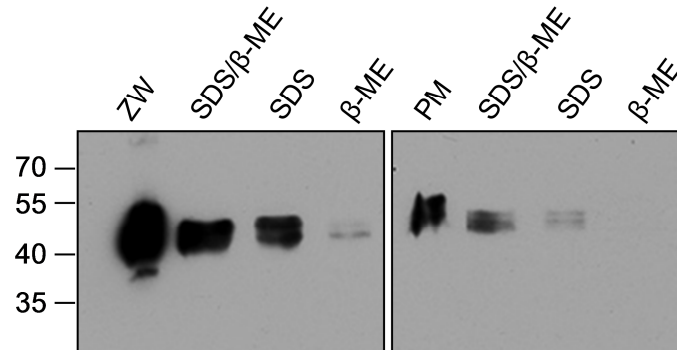


**Abb. 31: Ultradünnschnitte haploider Sporidien von SG200 und SG200 $\Delta$ um11464.** Sporidien von SG200 und SG200 $\Delta$ um11464 wurden hochdruckgefroren, kryofixiert und nach einer Epon-Einbettung ultradünn geschnitten. Die fertigen Präparate wurden mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop (JEOL JEM 2100, Tokyo) untersucht. Die Bildaufnahme erfolgte mittels einer 2k x 2k CCD-Kamera F214. Der Größenmaßstab beträgt 200 nm. ZW: pilzliche Zellwand; rER: raues Endoplasmatisches Retikulum; R: Ribosomen

### 2.8.5 Um11464 ist mit der pilzlichen Zellwand assoziiert

Eine Proteinverankerung in der pilzlichen Zellwand kann sowohl durch kovalente als auch nicht-kovalente Wechselwirkungen gewährleistet werden. Um zu untersuchen, über welchen Mechanismus Um11464 in der pilzlichen Zellwand verankert wird, wurde Um11464 als C-terminale StrepHA-Fusion unter Kontrolle des starken *oma* Promotors exprimiert und Sporidien dieses Stammes (SG200 $\Delta$ um11464-P<sub>oma</sub>11464StrepHA) während der exponentiellen Wachstumsphase in YEPS<sub>L</sub> geerntet. Anschließend wurde eine Fraktionierung in Zellwand- und Plasmamembran durchgeführt (vgl. Kapitel 4.6.1.3). Um nicht-kovalent gebundene Proteine zu entfernen, wurden die jeweiligen Fraktionen 1 - 2 Mal mit 2% SDS/ $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) behandelt und solubilisiertes Protein mittels HA-spezifischer Antikörper in Western-Analysen detektiert. Wie sich herausstellte, konnte Um11464 nach Behandlung mit 2% SDS/ $\beta$ -ME aus der Zellwand sowie in geringem Maße aus der Plasmamembran herausgelöst werden (Abb. 32). Um zu unterscheiden, ob es sich hierbei um eine nicht-kovalente Zellwandassoziation oder eine durch Disulfidbrücken bedingte Zellwandverknüpfung handelt, wurde eine Behandlung mit SDS oder  $\beta$ -ME allein

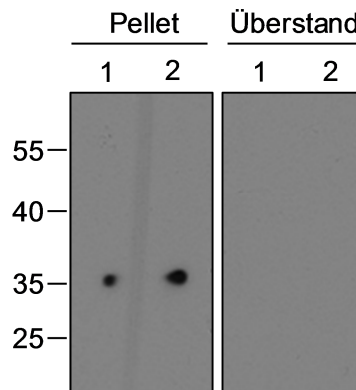
durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass Um11464 nur durch die Behandlung mit SDS, nicht aber durch  $\beta$ -ME solubilisiert wurde, was auf eine nicht-kovalente Zellwandassoziation hindeutet (Abb. 32).



**Abb. 32: Untersuchungen zur Extraktion von Um11464.** Zellen von SG200 $\Delta$ um11464- $P_{oma11464}$ StrepHA wurden während der exponentiellen Wachstumsphase in YEPS<sub>L</sub> geerntet und das Gesamtzellpellet in Zellwand (ZW) und Plasmamembran (PM) separiert. Beide Fraktionen wurden in 2% SDS/ $\beta$ -ME bzw. in 2% SDS oder  $\beta$ -ME allein gekocht, um nicht-kovalent gebundene Proteine zu extrahieren. Solubilisierte Proteine wurde in Western-Analysen mittels HA-spezifischer Antikörper detektiert. Der Größenstandard (kDa) ist links angegeben.

Obwohl eine nicht-kovalente Zellwand-Assoziation von Um11464 nachgewiesen werden konnte, muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass auch eine kovalente Verknüpfung von Um11464 mit der pilzlichen Zellwand nicht ausgeschlossen werden kann. Da Um11464 eine postulierte  $\omega$ -site zur GPI-Verankerung in der Proteinsequenz aufweist (vgl. Kapitel 2.1), muss davon ausgegangen werden, dass Um11464 zusätzlich durch einen GPI-Anker in der Zellwand verankert wird. Um dies zu testen, wurden die letzten 135 Aminosäuren von *um11464*, welche die postulierte  $\omega$ -site zur GPI-Verankerung enthielten, als N-terminale Fusion mit sekretiertem *gfp*-HA verknüpft und unter Kontrolle des *otef* Promotors in den *ip*-Lokus von SG200 $\Delta$ um11464 integriert. Der generierte Stamm SG200 $\Delta$ um11464- $P_{otef}$ -SP-GFPHA-11464 <sup>$\Delta$ 21-181</sup> wurde für mikroskopische Analysen verwendet und sollte ein GFP-Signal in der Zellperipherie zeigen, sofern der C-Terminus von Um11464 tatsächlich prozessiert und durch einen GPI-Anker ersetzt wird. Allerdings konnte weder in Sporidien noch in *in vitro* generierten Filamenten ein GFP-Signal in der Zellperipherie detektiert werden (nicht gezeigt). In Western-Analysen des Gesamtzellpellets und Kulturüberstandes konnte allerdings gezeigt werden, dass das ca. 36 kDa große GFPHA-Um11464 <sup>$\Delta$ 21-181</sup>-Fusionsprotein als schwache Expressionbande in der Pelletfraktion detektierbar war (Abb. 33). Eine Detektion des Fusionsproteins im Kulturüberstand war nicht möglich (Abb. 33). Dies könnte darauf hindeuten, dass das

GFPHA-Um11464<sup>Δ21-181</sup>-Fusionsprotein durch einen GPI-Anker in der Zellperipherie verankert wird.

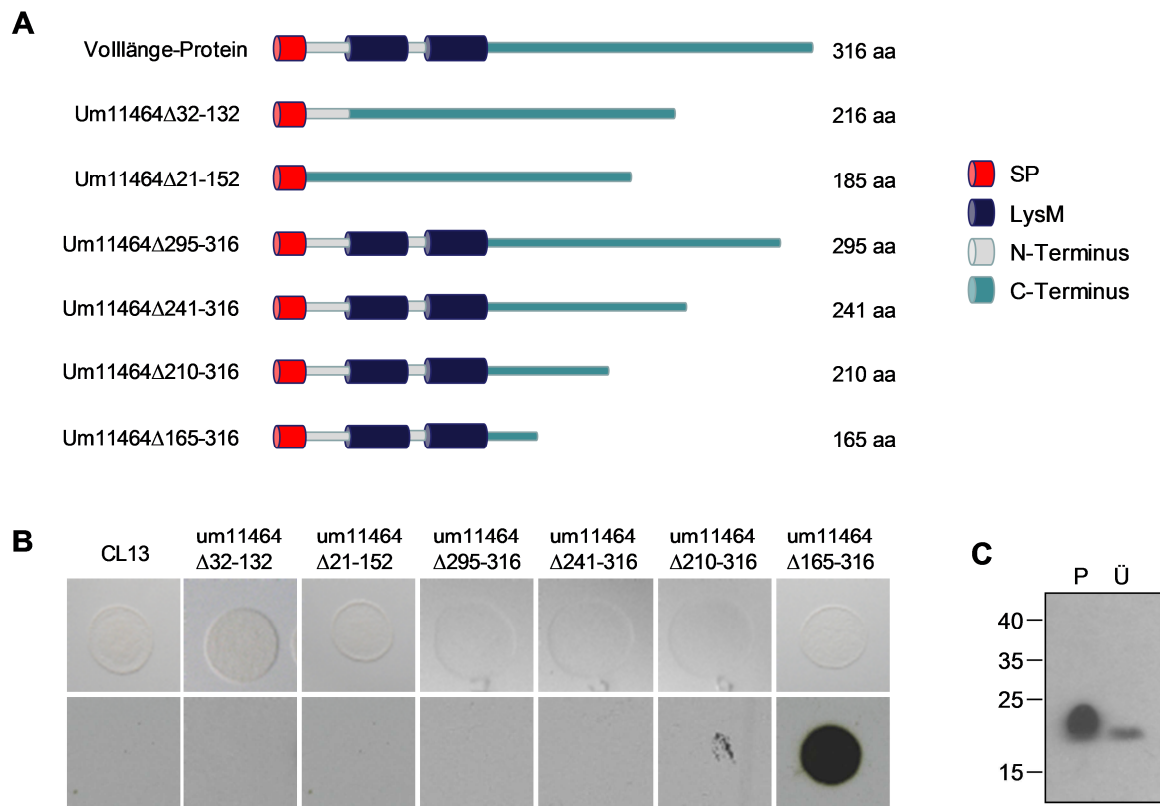


**Abb. 33: Western-Analyse zum Nachweis der Expression des GFPHA-Fusionsproteins.** Zwei unabhängige Stämme von SG200Δum11464-P<sub>otef</sub>-SP-GFPHA-11464<sup>Δ21-181</sup> (1 und 2) wurden während der exponentiellen Wachstumsphase in YEPS<sub>L</sub> durch Zentrifugation in Zellpellet- und Kulturüberstand separiert. Nach TCA-Fällung des Kulturüberstandes wurden beide Fraktionen unter Verwendung HA-spezifischer Antikörper in Western-Analysen hinsichtlich der Proteinexpression untersucht. Der Größenstandard (kDa) ist links angegeben.

### 2.8.6 Die nicht-kovalente Zellwandassoziation von Um11464 wird durch den C-Terminus bewerkstelligt

Wie aus den bisherigen Ergebnissen hervorgeht, wird Um11464 unter anderem über nicht-kovalente Wechselwirkungen in der pilzlichen Zellwand verankert (vgl. Kapitel 2.8.5). Da die Verankerung des Proteins dessen Freisetzung in den Extrazellularraum verhindert, erklärt sich, weshalb eine Detektion des Volllängeproteins in Kulturüberständen nicht möglich war (vgl. Kapitel 2.8.2). Um zu analysieren, welcher Bereich des Proteins für die nicht-kovalente Zellwandverankerung verantwortlich ist, wurden verschiedene HA-getaggte Um11464-Allele generiert und unter Kontrolle des nativen Promotors in einfacher Kopienzahl in den *ip*-Lokus des Stammes CL13Δum11464 integriert. Die Freisetzung der Fusionsproteine in den Kulturüberstand wurde anschließend im Kolonie-Sekretionstest überprüft. Neben der Deletion des kompletten, die LysM-Domänen enthaltenden N-Terminus (Um11464<sup>Δ21-152</sup>-HA) wurde auch ein Um11464-Allel generiert, dem der komplette, wenig konservierte C-Terminus (Um11464<sup>Δ165-316</sup>-HA) fehlt (Abb. 34A). Zusätzlich wurde eine interne Deletion der beiden LysM-Domänen (Um11464<sup>Δ32-132</sup>-HA) vorgenommen (Abb. 34A). Wie sich herausstellte, konnte nur für Um11464<sup>Δ165-316</sup>-HA, welches der C-terminalen Deletion entspricht, ein Signal im Kolonie-Sekretionstest erhalten werden (Abb. 34B). Um die Sekretion von Um11464<sup>Δ165-316</sup>-HA zu verifizieren, wurde eine Western-Analyse des Zellpellets und Kulturüberstandes durchgeführt. Das 20

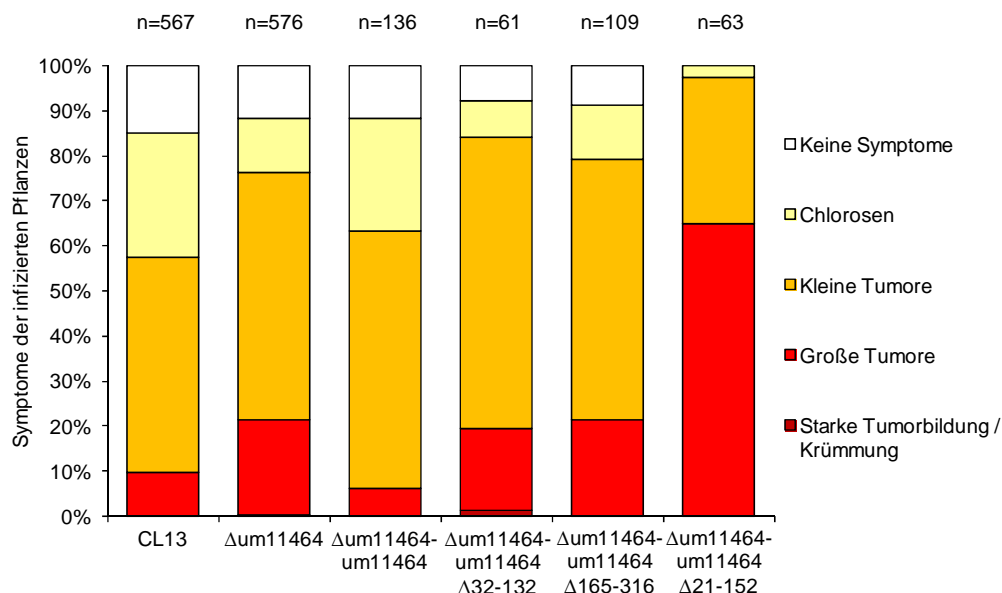
kDa große Fusionsprotein konnte in beiden Fraktionen mittels anti-HA Antikörpern detektiert werden (Abb. 34C).



**Abb. 34: Lokalisation der verkürzten Um11464-Proteine.** **A:** Schematische Darstellung des Volllängeproteins sowie der verkürzten Um11464-Allele. **B:** Kolonie-Sekretionstest. Zellsuspensionen von CL13, CL13 $\Delta$ um11464-um11464 $^{\Delta 32-132}$ -HA, CL13 $\Delta$ um11464-um11464 $^{\Delta 21-152}$ -HA, CL13 $\Delta$ um11464-um11464 $^{\Delta 295-316}$ -HA, CL13 $\Delta$ um11464-um11464 $^{\Delta 241-316}$ -HA, CL13 $\Delta$ um11464-um11464 $^{\Delta 210-316}$ -HA und CL13 $\Delta$ um11464-um11464 $^{\Delta 165-316}$ -HA wurden in YEPS<sub>L</sub> kultiviert und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran getropft (oben). Sekretierte Proteine wurden nach Entfernung der Kolonien mittels HA-spezifischer Antikörper nachgewiesen (unten). **C:** Western-Analyse zum Nachweis des verkürzten Um11464 $^{\Delta 165-316}$ -Proteins in Zellpellet (P) und Kulturüberstand (Ü). Der Stamm CL13 $\Delta$ um11464-um11464 $^{\Delta 165-316}$ -HA wurde während der exponentiellen Wachstumsphase in YEPS<sub>L</sub> durch Zentrifugation in Zellpellet und Kulturüberstand separiert. Nach TCA-Fällung des Kulturüberstandes wurden beide Fraktionen unter Verwendung HA-spezifischer Antikörper in Western-Analysen hinsichtlich der Um11464 Sekretion untersucht. Der Größenstandard (kDa) ist links angegeben.

Um den C-terminalen Bereich einzugrenzen, der für die nicht-kovalente Verankerung des Um11464-Proteins in der Zellwand verantwortlich ist, wurden Verkürzungen des C-Terminus vorgenommen. Hierzu wurden weitere HA-getaggte Um11464-Allele generiert, deren C-terminale Enden um 20 Aminosäuren (Um11464 $^{\Delta 295-316}$ -HA), 75 Aminosäuren (Um11464 $^{\Delta 241-316}$ ) bzw. 100 Aminosäuren (Um11464 $^{\Delta 210-316}$ ) verkürzt waren (Abb. 34A). Die Konstrukte wurden unter Kontrolle des nativen Promotors in einfacher Kopienzahl in den *ip*-Lokus des Stammes CL13 $\Delta$ um11464 integriert und die Freisetzung der

Fusionsproteine in den Kulturüberstand im Kolonie-Sekretionstest überprüft. Es zeigte sich, dass keines der C-terminal verkürzten Fusions-Proteine im Kolonie-Sekretionstest detektiert werden konnte (Abb. 34B). Erst, wenn von dem bereits verkürzten Protein Um11464<sup>Δ210-316</sup> weitere 45 Aminosäuren deletiert wurden, was wieder der kompletten C-terminalen Deletion entspricht (Um11464<sup>Δ165-316</sup>-HA), konnte das Protein als sekretiert detektiert werden (Abb. 34B). Der für die nicht-kovalente Verankerung von Um11464 verantwortliche Bereich scheint somit zwischen den Aminosäuren 165 und 210 zu liegen. Die Stämme CL13Δum11464-um11464<sup>Δ32-132</sup>-HA, CL13Δum11464-um11464<sup>Δ21-152</sup>-HA und CL13Δum11464-um11464<sup>Δ165-316</sup>-HA wurden des Weiteren hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Komplementation des Virulenzphänotyps getestet. Dazu wurden die Stämme in YEPS<sub>L</sub> angezogen und in sieben Tage alte Maispflanzen injiziert. Zwölf Tage nach Infektion wurden die Symptome der Pflanzen begutachtet.



**Abb. 35: Virulenz der Stämme mit verkürzten Um11464-Proteinen.** Zellsuspensionen der angegebenen Stämme wurden mittels Spritzinfektion in sieben Tage alte Maispflanzen injiziert. Pflanzensymptome wurden zwölf Tage nach Infektion quantifiziert. Die Werte von drei bzw. im Fall der Stämme CL13Δum11464-um11464<sup>Δ32-132</sup> und CL13Δum11464-um11464<sup>Δ21-152</sup> von zwei unabhängigen Infektionen wurden gemittelt und prozentual zur Gesamtzahl der infizierten Pflanzen (n) dargestellt.

Es zeigte sich, dass die Stämme im Vergleich zum Komplementationsstamm CL13Δum11464-um11464HA nicht in der Lage waren, den hypervirulenten Phänotyp der *um11464* Deletionsmutante zu komplementieren (Abb. 35). Der Stamm CL13Δum11464-um11464<sup>Δ21-152</sup>-HA, in welchem der komplette N-Terminus fehlt, wies sogar noch mehr große Tumore auf als die *um11464* Deletionsmutante (Abb. 35). Allerdings wurde diese



Infektion erst zweifach durchgeführt und ist somit nicht statistisch abgesichert. Dennoch lassen die Ergebnisse vermuten, dass sowohl der N-Terminus mit den LysM-Domänen als auch der C-Terminus von Um11464 essentiell für die Proteinfunktion sein könnte und dass nur beide Teile zusammen ein funktionstüchtiges Protein ergeben.

### 3 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Funktion des Gens *um11464* untersucht, welches für ein LysM-Protein kodiert. Dabei zeigte sich, dass *um11464* Mutanten eine veränderte Morphologie in Flüssigkultur sowie eine erhöhte Sensitivität gegenüber Zellwandstressoren aufwiesen. Ferner wirkte sich die Deletion von *um11464* positiv auf die Filament- und Appressorienbildung aus und führte in Pflanze zu einem hypervirulenten Phänotyp, welcher unter anderem durch eine verstärkte Unterdrückung der pflanzlichen Abwehr als Reaktion auf die *um11464* Gendeletion begünstigt wird.

#### 3.1 Das LysM-Protein Um11464

LysM-Proteine phytopathogener Pilze sind als Virulenzfaktoren beschrieben, da sie unter anderem in der Lage sind, die pflanzliche Immunabwehr durch das Abfangen pilzlicher PAMPs zu unterdrücken (Bolton *et al.*, 2008; de Jonge und Thomma, 2009). Dies setzt eine hohe Affinität der Proteine zu diversen Polysacchariden voraus. Eines der best untersuchtesten Beispiele hierfür ist der LysM-Effektor Ecp6 von *C. fulvum* (de Jonge *et al.*, 2010). Ecp6 bindet effizient Chitin-Monomere, welche durch pflanzliche Chitinasen aus der pilzlichen Zellwand in den Apoplasten freigesetzt werden. Dadurch verhindert *C. fulvum* eine PAMP-vermittelte Immunabwehr, bleibt somit unerkant und kann seine Wirtspflanze ungehindert infizieren. Die hohe Affinität von Ecp6 zu dem Chito-Oligosaccharid Chitin wird dabei durch drei, hintereinander geschaltete Lysin-Motive vermittelt (de Jonge *et al.*, 2010). Neben diesen enthält Ecp6 keine weiteren, funktionellen Proteindomänen. Eine ähnliche Situation findet sich in dem *M. oryzae* Effektorprotein Slp1. Auch dieses bindet Chitin mit hoher Affinität, benötigt hierfür jedoch nur zwei Lysin-Motive (Mentlak *et al.*, 2012). In beide Proteinen erstrecken sich die Lysin-Motive über die gesamte Proteinlänge. Dies ist in Um11464 von *U. maydis* anders. Zwar weist die Um11464 Proteinsequenz ebenfalls zwei eng benachbarte, N-terminale Lysin-Motive auf, allerdings besitzt das Protein zusätzlich einen ca. 180 Aminosäuren langen C-Terminus ohne erkennbare Proteindomäne. Eine Affinität des Proteins zu Chitin und anderen Polysacchariden wie etwa dem pilzlichen Chitosan oder aber zu bakteriellen und pflanzlichen Zellwandbestandteilen wie Peptidoglukan, Cellulose, Pektin oder Xylan konnte nicht gezeigt werden. Dennoch kann eine Polysaccharid-Bindung von Um11464

derzeit nicht völlig ausgeschlossen werden, da gezeigt werden konnte, dass das native Um11464-Protein N- und O-glykosidische Modifikationen trägt. Die Gewährleistung post-translationaler Modifikationen während der Proteinexpression könnte Voraussetzung für eine korrekte Proteinfaltung und -funktionalität sein. Da Um11464 ohne Signalpeptidsequenz in *N. benthamiana* exprimiert wurde, kann es sein, dass eine Affinität zu den beschriebenen Oligosacchariden nicht nachgewiesen werden konnte, da aufgrund falscher Proteinfaltung ein Funktionsverlust eintrat und somit keine Bindung möglich war. Es wäre auch denkbar, dass die LysM-Bindestelle des heterolog exprimierten Proteins während der Proteinsynthese in Tabak bereits besetzt wurde, möglicherweise durch Bestandteile der pflanzlichen Zellwand. Darüber hinaus ist ein so langer, C-terminaler Proteinbereich ohne erkennbare funktionelle Domäne, wie er in Um11464 vorhanden ist, für „echte“ LysM-Proteine unüblich. Diese sind in der Regel nur aus Lysin-Motiven aufgebaut (B.P.H.J. Thomma, Universität Wageningen; pers. Mitteilung). Laut B.P.H.J. Thomma (pers. Mitteilung) sollte Um11464 daher nicht als typisches LysM-Protein, sondern eher als Protein mit Lysin-Motiven bezeichnet werden.

Ob Um11464 in der Lage ist, Oligosaccharide zu binden, und wenn ja, welche, bleibt somit offen und bedarf weiterer Analysen. Hierzu sollte Um11464 auf jeden Fall unter Gewährleistung post-translationaler Modifikationen exprimiert werden, um eine korrekte Faltung und Funktionalität des Proteins zu gewährleisten. Es ist allerdings auch denkbar, dass *U. maydis* aufgrund der Vielzahl sekretierter Effektorproteine mit Virulenzfunktion gar nicht auf LysM-Proteine und deren Funktion als „Chitin-Fänger“ angewiesen ist, um eine PAMP-vermittelte Resistenz seiner Wirtspflanze *Z. mays* zu unterdrücken. Es stellt sich somit die Frage, welche Rolle die Lysin-Motive im Um11464-Protein erfüllen und welche Auswirkungen dies auf den Lebensstil von *U. maydis* hat. Aufgrund der hohen Konservierung des Lysin-Motivs im Allgemeinen als auch aufgrund der hohen Aminosäureidentität dieser Domänen in Um11464 von *U. maydis* und seinen orthologen Proteinen in *U. hordei*, *S. scitamineum* und *S. reilianum* ist jedoch davon auszugehen, dass dieser Bereich für die Funktion der jeweiligen Proteine eine wichtige Rolle spielt.

### **3.2 Um11464 reguliert die Zellwandbeschaffenheit von *U. maydis***

Die Deletion des Gens *um11464* resultierte bereits in axenischer Kultur in einer veränderten Morphologie der Sporidien. Die *um11464* Deletionsmutante wies eine erhöhte Bildung bipolarer und lateral knospender Zellen sowie die Bildung längerer Zellketten auf.

Die veränderte Zellform war dabei unter anderem auf eine Abnormalität in der Septenbildung zurückzuführen, welche für eine erfolgreiche Zellteilung in *U. maydis* unerlässlich ist. Eine Visualisierung der Septen durch Färbung mit Calcofluor White, welches das Chitin der pilzlichen Zellwand bindet, verdeutlichte, dass zwar ein primäres und ein sekundäres Septum gebildet wurde, dies jedoch signifikant seltener vorkam als im Referenzstamm SG200. Stattdessen wies die *um11464* Deletionsmutante mit erhöhter Frequenz ein zentrales Septum auf. Ein solches konnte bereits in der *rac1* Mutante von *U. maydis* beobachtet werden (Mahlert *et al.*, 2006). Die Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 sind entscheidend an der Regulation des Aktin-Cytoskeletts beteiligt (Nobes und Hall, 1995). Deletionen von Rac1 oder Cdc42 allein haben keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit von *U. maydis*, steuern jedoch Zellteilung und Zellpolarität. Deletionen des *rac1* Gens resultieren unter anderem in einer gestörten Knospenbildung (Mahlert *et al.*, 2006). Um diesen Defekt auszugleichen, bilden *rac1* Mutanten ein zentrales Septum aus. Dieses scheint eine Zellteilung durch Spaltung zu gewährleisten, welche so effizient ist, dass kein Wachstumsdefekt der *rac1* Mutanten beobachtet werden konnte (Mahlert *et al.*, 2006). In *um11464* Mutanten konnte keine Beeinträchtigung der Knospenbildung beobachtet werden. Die Bildung längerer Zellketten deutet allerdings darauf hin, dass die Abschnürung der gebildeten Tochterzellen beeinträchtigt sein könnte. Dennoch konnte kein Wachstumsdefekt beobachtet werden, weshalb davon auszugehen ist, dass das zentrale Septum der *um11464* Deletionsmutante einen ähnlichen Zellteilungsmechanismus erlaubt wie für *rac1* Mutanten beschrieben.

Weiterführende, elektronenmikroskopische Analysen verdeutlichten, dass die Zellwand von *um11464* Deletionsmutanten wesentlich dicker erschien als in Wildtyp-Sporidien. Des Weiteren konnten in *um11464* Mutanten keine „Fimbrien“ auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Solche Strukturen sind in Pilzen weit verbreitet und dienen unter anderem der Erkennung, Anheftung und Pathogenität (Rghei, 1991; Yu *et al.*, 1994). Unabhängige Studien zeigten, dass Fimbrien aus Glykoproteinen bestehen (Gardiner *et al.*, 1982; Xu und Day, 1992; Yu *et al.*, 1994). Dabei wird angenommen, dass die Proteinkomponente der Fimbrien hoch konserviert ist, während die Art der Glykosylierung stark variieren kann (Celerin und Day, 1998). Allein in *U. maydis* wurden drei verschiedene Fimbrien-Typen identifiziert, welche sich in ihrer Dicke und Länge unterscheiden (Xu und Day, 1992). Bei den Ustilaginaceae wird die Besetzung der pilzlichen Zelloberfläche mit Fimbrien für eine erfolgreiche Adhäsion auf der Oberfläche der jeweiligen Wirtspflanzen verantwortlich gemacht (Rghei, 1991). In *um11464* Mutanten

wurde die Adhesion auf der Pflanzenoberfläche zwar nicht getestet und ein Fehlen der Fimbrien in Filamenten kann nur vermutet werden, da die Analysen hierzu bisher nur in Sporidien vorgenommen wurden. Allerdings konnte keine Beeinträchtigung der Differenzierungs- und Penetrationsvorgänge auf der Pflanzenoberfläche beobachtet werden. Möglicherweise werden *um11464* Deletionsmutanten, deren Fimbrien fehlen, schlechter bzw. später von der Pflanze erkannt. Eine verzögerte Pflanzenreaktion wiederum könnte die Differenzierungsprozesse der *um11464* Mutante begünstigt haben und damit die Hypervirulenz erklären.

Im Allgemeinen stellt die Zellwand mit all ihren Bestandteilen ein zellformendes Organ dar, dass nicht nur vor äußeren Einflüssen schützt, sondern auch den ersten Kontakt zum Wirt gewährleistet (Ruiz-Herrera *et al.*, 2008). Eine intakte Zellwandbeschaffenheit ist daher unentbehrlich für die Virulenz vieler pathogener Organismen. *Cryptococcus neoformans*, ein Humanpathogen, ist neben seiner Plasmamembran von einer aus Polysacchariden bestehenden Zellwand umgeben. Darüber liegt eine dicke Polysaccharid-Kapsel (Doering, 2009), die über  $\alpha$ -1,3-glykosidische Bindungen in der Zellwand verankert und essentiell für die Virulenz von *C. neoformans* ist (Chang und Kwon-Chung, 1994). Eine Deletion der einzigen  $\alpha$ -1,3-Glukan Synthase *Ags1* resultiert in einer stark veränderten Zellwand, welche aufgequollen erscheint und sich durch das Fehlen der Polysaccharid-Kapsel auszeichnet (Reese *et al.*, 2007). In *ags1* Mutanten beobachtet man eine verstärkte Chitin- und Chitosan-Synthese, die vermutlich dazu dient, die Zellwandintegrität aufrecht zu erhalten. Trotzdem zeigten *ags1* Mutanten eine erhöhte Sensitivität gegenüber Zellwandstressoren und waren nicht in der Lage, im Mausmodell eine Infektion auszulösen (Reese *et al.*, 2007). Auch in dem pilzlichen Pathogen *Histoplasma capsulatum* führt der Verlust des Zellwandpolymers  $\alpha$ -1,3-Glukan zu einer veränderten Morphologie und wirkt sich negativ auf die Virulenz aus (Rappleye *et al.*, 2004). In *Blastomyces dermatitidis* wird neben dem  $\alpha$ -1,3-Glukan ein weiteres Adhäsionsprotein benötigt, um die volle Virulenz dieses Humanpathogens zu gewährleisten. Das 120 kDa große Protein BAD1, früher WI-1 genannt, sorgt nicht nur für eine effiziente Adhäsion von *B. dermatitidis* an die Phagocyten, es verhindert zudem die Produktion des Cytokins TNF- $\alpha$  und unterdrückt dadurch die Abwehrreaktion seines Wirtes (Finkel-Jimenez *et al.*, 2002). Diese Beispiele illustrieren die Notwendigkeit einer intakten Zellwandassemblierung als Voraussetzung für Stressresistenz und einen pathogenen Lebensstil. Auch in *U. maydis* resultierte der *um11464* Genverlust in einer abnormalen Zellmorphologie sowie einer stark veränderten Zellwand- und

Oberflächenstruktur. Dies wiederum schien die erhöhte Sensitivität gegenüber den Stressoren Kongorot und Calcofluor zu bedingen – beides Komponenten, die die Assemblierung von Zellwandpolymeren unterbinden. Aufgrund dessen wird angenommen, dass es sich bei Um11464 um ein strukturelles und Zellwand-stabilisierendes Protein handelt, welches zur Zellwandintegrität beiträgt. In diesem Zusammenhang wäre es interessant der Frage nachzugehen, ob die *um11464* Deletion neben einer Oberflächenstrukturveränderung auch eine veränderte Zellwandkomposition bedingt. Die Auftrennung und Identifikation bzw. Quantifizierung der einzelnen Zellwandbestandteile könnte durch die Kombination einer Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektroskopie erreicht werden und würde ggf. weitere Ansatzpunkte zur Erklärung des Virulenzphänotyps liefern.

### 3.3 Um11464 lokalisiert in der pilzlichen Zellwand

Um11464 besitzt ein putatives, N-terminales Signalpeptid, welches in der Hefesignalsequenzfalle als funktional bestimmt wurde. Zusätzlich wurde gezeigt, dass eine Deletion der Um11464 Signalpeptidsequenz einen Funktionsverlust des Proteins bedingt, welcher sich in einer gesteigerten Sensitivität der Mutante auf Zellwand-destabilisierende Stressoren äußerte. Dieser Defekt ließ sich aufheben, indem die Um11464-Signalpeptidsequenz durch die Signalpeptidsequenz des sekretierten *U. maydis* Effektors CmuI ersetzt wurde und lässt vermuten, dass eine Sekretion des Um11464 Proteins für dessen Funktionalität essentiell ist. Trotz allem konnte das Volllängeprotein zu keinem Zeitpunkt in Kulturüberständen identifiziert werden. Aufgrund dieser Tatsache wurde spekuliert, dass Um11464 nicht in den Extrazellularraum abgegeben wird, sondern in der pilzlichen Zellwand verankert ist.

Die pilzliche Zellwand schützt die Zellen vor äußeren Einflüssen und erlaubt eine erste Kontaktaufnahme zu anderen Zellen bzw. Substraten (Bowman und Free, 2006; Latge, 2007; Ruiz-Herrera *et al.*, 2008). Hauptbestandteil der pilzlichen Zellwand ist das strukturelle Polymer Glukan, welches 50-60% der Zellwand-Trockenmasse ausmachen kann (Bowman und Free, 2006). Zusätzlich tragen die Polymere Chitin, Chitosan und Cellulose zum Aufbau des Zellwand-Grundgerüsts bei, wobei die Komponenten nicht einzeln vorliegen, sondern durch kovalente Verknüpfungen bzw. über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander vernetzt sind (Wessels, 1994). Darin eingebettet finden sich eine Vielzahl von Glykoproteinen mit zumeist enzymatischer

Funktion. Diese werden auf ihrem sekretorischen Weg durch ER und Golgi durch das Anhängen einer oder mehrerer Kohlenhydratketten modifiziert und entweder kovalent oder nicht-kovalent mit dem Chitin-Glukan-Komplex der Zellwand verknüpft (Bowman und Free, 2006). Vereinzelte Proteine, welche eine spezielle C-terminale Signalsequenz besitzen, können zusätzlich mit einem Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker versehen und über diesen mit der Plasmamembran oder in einigen Fällen auch mit der Zellwand verbunden werden (Gilbert *et al.*, 2012; Kapteyn *et al.*, 1995; Plaine *et al.*, 2008).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen nach Immunmarkierung mittels Um11464-spezifischer Antikörper verdeutlichten, dass Um11464 ausschließlich in der pilzlichen Zellwand lokalisierte. Da es sich um ein sekretiertes Protein handelt, konnte vereinzelt auch ein Signal im ER detektiert werden, welches sich im Falle einer Protein-Überexpression verstärkte. Eine vermutete Zellwandverankerung des Um11464 Proteins durch seine Lysin-Motive, welche in anderen Organismen hohe Affinität zu diversen Polysacchariden zeigen und unter anderem zur Anbindung an die pilzliche Zellwand befähigen (van den Burg *et al.*, 2006; van Esse *et al.*, 2007), konnte nicht gezeigt werden. Ein Um11464-Deletionskonstrukt, dem beide LysM-Motive fehlten, lokalisierte noch immer in der Pelletfraktion und konnte nicht als sekretiert detektiert werden. Durch weitere Deletionsanalysen konnte aber gezeigt werden, dass eine 45 Aminosäuren umspannende Region innerhalb des C-Terminus zu einer nicht-kovalenten Assoziation des Um11464-Proteins mit der pilzlichen Zellwand führt. Nicht-kovalent verknüpfte Zellwandproteine können durch Behandlung mit reduzierenden Detergenzien wie SDS oder  $\beta$ -Mercaptoethanol extrahiert werden (Kapteyn *et al.*, 1995). Es kommt aber auch vor, dass nicht-kovalente Wechselwirkungen sehr stark sind und selbst nach mehreren SDS-Behandlungen noch Protein in der Zellwandfraktion detektierbar ist (Bernard *et al.*, 2002). Bei Um11464 war dies der Fall, denn auch nach zweifacher Extraktion mit 2% SDS konnte neben Um11464 im Überstand immer noch Protein in der Zellwandfraktion nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Diese starke, nicht-kovalente Zellwandassoziation in Kombination mit dem strukturgebenden und stabilisierenden Effekt, welchen Um11464 auf die Zellwand ausübt, lassen vermuten, dass Um11464 seinen Wirkungsort in der Zellwand hat und dass eine Verankerung des Proteins in diesem Kompartiment essentiell für die Proteinfunktion sein könnte. Darüber hinaus kann derzeit eine zusätzliche kovalente Zellwandverankerung von Um11464 durch einen GPI-Anker nicht ausgeschlossen werden. An der Aminosäureposition 291 im C-Terminus von Um11464 findet sich eine vorhergesagte  $\omega$ -site zur Anknüpfung eines GPI-Ankers. Diese wurde bei den

Deletionsanalysen, die die nicht-kovalente Verankerung von Um11464 zeigten, entfernt. Für mikroskopische Analysen zur Verifizierung eines GPI-Ankers wurde allerdings ein Um11464-Fusionskonstrukt generiert, bei dem sekretiertes *gfp*-HA am C-Terminus mit der postulierten  $\omega$ -site von *um11464* fusioniert wurde. Es wurde ein GFP-Signal in der Zellperipherie erwartet, sofern der C-Terminus von Um11464 prozessiert und durch einen GPI-Anker ersetzt wird. Leider konnte kein GFP-Signal in der Zellperipherie detektiert werden, was allerdings daran liegen könnte, dass das GFP in der Peripherie der Zelle nicht leuchtet und somit nicht nachweisbar ist. Jedoch konnte das GFPHA-Um11464-Fusionsprotein in Western-Analysen detektiert werden. Es lokalisierte ausschließlich in der Pelletfraktion, was eine GPI-Verankerung bekräftigen könnte. Es bedarf jedoch weiterer Analysen, um eine mögliche kovalente Zellwandverankerung von Um11464 aufzuzeigen.

### **3.4 Um11464 wirkt sich negativ auf die pathogene Entwicklung von *U. maydis* aus**

Die pathogene Entwicklung von *U. maydis* ist eng mit der seiner Wirtspflanze verknüpft und setzt einen durch die *a* und *b* Gene induzierten Differenzierungsprozess voraus. Die Pflanzenoberfläche liefert dabei wichtige Signale, insbesondere Hydrophobizität und einen Fettsäurestimulus, um die Bildung von Filamenten und Appressorien zu induzieren. Auch *in vitro* können jene Prozesse nachvollzogen werden, wobei Hydroxy-Fettsäuren allein die Bildung unseptierter Filamente ohne ein Appressorium induzieren. Diese Reaktion war in der *um11464* Mutante verstärkt zu beobachten, was möglicherweise durch eine verbesserte Zugänglichkeit des Hydroxy-Fettsäurerezeptors in der Plasmamembran erklärt werden könnte. Artifizielle, hydrophobe Oberflächen wie z.B. Parafilm begünstigen hingegen die Appressorienbildung, welche durch einen Fettsäurestimulus weiter erhöht werden kann (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009). Die Appressorienbildung der *um11464* Mutante *in vitro* blieb jedoch im Vergleich zum Referenzstamm unverändert. Erst unter *in vivo*-Bedingungen war ein signifikanter Anstieg der Appressorienbildung in der Mutante zu beobachten. Dies lässt darauf schließen, dass weitere, bisher unbekannte Pflanzenstimuli die Appressorienbildung in *U. maydis* begünstigen können. Die signifikant erhöhte Appressorienbildung der *um11464* Mutante führte zu einer leicht erhöhten Penetration und begünstigte die Kolonisation des Pflanzengewebes. Der hypervirulente Phänotyp der *um11464* Mutante in Pflanze könnte folglich auf eine erhöhte Appressorienbildung zurückgeführt werden. Ein ähnliches Phänomen wurde bereits für die *rok1* Mutante in *U.*



*maydis* beobachtet. Die dual-spezifische Phosphatase Rok1 ist ein negativer Regulator der Filament- und Appressorienbildung. Die Hypervirulenz der *rok1* Mutanten wurde ebenfalls auf eine erhöhte Appressorienbildung zurückgeführt (Di Stasio *et al.*, 2009).

Hypervirulente Mutanten nach Deletion verschiedener sekretorischer, oberflächenpräsentierter bzw. regulatorischer Proteine wurden auch in *Mycobacterium tuberculosis* beschrieben (ten Bokum *et al.*, 2008). Die Hypervirulenz der entsprechenden *M. tuberculosis* Mutanten äußerte sich dabei in einem verstärkten Wachstum der Zellen, einer verstärkten Unterdrückung der Wirts-Immunreaktion, u.a. durch die Modulation der nach außen präsentierten Antigene, sowie einer erhöhten Pathogenität (ten Bokum *et al.*, 2008). Die Deletion von Ace2, einem Transkriptionsfaktor in *Candida glabrata*, resultierte in einer gestörten Zellteilung sowie einer erhöhten systemischen Infektion im Mausmodell. Man vermutet, dass *ace2* Mutanten eine veränderte Immunreaktion ihres Wirtes hervorrufen, was zu dem hypervirulenten Phänotyp geführt haben könnte. Allerdings wird die veränderte Zellmorphologie als Nebeneffekt betrachtet, der unabhängig von der Hypervirulenz auftritt (Kamran *et al.*, 2004). Bei der Deletion des  $\alpha$ -1,3-Glukan-Synthase Gens *ags3* in *Aspergillus fumigatus* wurde ebenfalls ein hypervirulenter Phänotyp beobachtet, der auf einen erhöhten Melaniningehalt der Konidien und der damit verbundenen Resistenz gegenüber reaktiver Sauerstoffspezies zurückgeführt wird. Für Ags3 wird demnach eine indirekte Rolle für die Virulenz von *A. fumigatus* angenommen (Maubon *et al.*, 2006).

Ein indirekter Einfluss auf die Virulenz von *U. maydis* wäre auch für Um11464 denkbar. Die veränderte Oberflächenstruktur könnte bedingt haben, dass die *um11464* Deletionsmutante schlechter von ihrem Wirt erkannt wird, da gewisse Komponenten, die als PAMPs fungieren, nicht mehr vorhanden oder in ihrer Zugänglichkeit verändert sind. Eine daraus resultierende, verminderte Abwehrreaktion der Pflanze könnte somit als Begründung der Hypervirulenz herangezogen werden. Es wäre allerdings auch möglich, dass durch die beobachtete Veränderung in der Zellwandbeschaffenheit nach *um11464* Deletion eine verbesserte Wahrnehmung der pflanzlichen Oberfläche sowie der chemischen Pflanzenstimuli ermöglicht wird. Auch eine verbesserte Aufnahme und Weiterleitung der Reize, u.a. durch erleichterte Diffusion der Moleküle durch die Zellwand, wäre denkbar. Die verbesserte Perzeption der Reize könnte folglich die verstärkte Bildung von Infektionsstrukturen begünstigt und zur Hypervirulenz geführt haben. Während ein indirekter Einfluss von Um11464 auf die Virulenz von *U. maydis* durch die beschriebenen Auswirkungen der *um11464* Deletion auf die pilzliche Zellwand

begründet werden kann, ist auch ein direkter Einfluss des Um11464-Proteins auf die Virulenz nicht auszuschließen. Überexpressionsanalysen verdeutlichten, dass die vermehrte Tumorbildung der *um11464* Deletionsmutante durch eine erhöhte *um11464* Expression aufgehoben werden kann. Ein *um11464* Überexpressionsstamm wies eine im Vergleich zum Referenzstamm verminderte Virulenz auf, vor allem hinsichtlich toter Pflanzen und starker Tumorbildung. Dies wiederum sind typische Reaktionen auf einen Elicitor. Um11464 könnte demnach auch direkt an der Virulenz des Pilzes beteiligt sein, in dem das Protein selbst als PAMP fungiert und eine verstärkte pflanzliche Abwehrreaktion hervorruft. Allerdings bleibt offen, welcher Teil des Um11464-Proteins zur Virulenz beiträgt. Deletionsanalysen konnten zeigen, dass der Verlust der LysM-Motive im N-Terminus bereits ausreicht, um in Pflanze Hypervirulenz zu erzielen. Allerdings resultierte auch eine *um11464* Mutante, deren C-Terminus deletiert wurde, in einem hypervirulenten Phänotyp. Dies könnte erklärt werden, wenn der C-Terminus für eine essentielle kovalente Zellwandverankerung verantwortlich ist. Es wäre auch denkbar, dass die Deletion von N- oder C-Terminus die Faltung des Um11464 Proteins negativ beeinflusst. Dies könnte mit einem Funktionsverlust verbunden sein und käme der kompletten Gendeletion gleich. Folglich bedarf es weiterer Analysen, um den für das Virulenzverhalten von *um11464* Deletionsmutanten verantwortlichen Um11464-Proteinbereich zu identifizieren.

Zusammenfassend sei bemerkt, dass Gene, deren Deletion zu einem hypervirulenten Phänotyp führen, mittlerweile keine Seltenheit mehr sind. Dabei wird die Unterdrückung der Pathogenität als Beitrag zur allgemeinen Fitness gesehen (Foreman-Wykert und Miller, 2003). Vor allem im Falle einer biotrophen Interaktion können sogenannte „Anti-Virulenzgene“ die frühzeitige Bildung von Symptomen unterdrücken und verhindern somit ein vorzeitiges Absterben ihres Wirtes (Foreman-Wykert und Miller, 2003; Kämper *et al.*, 2006; ten Bokum *et al.*, 2008). Da *U. maydis* als biotropher Pilz auf lebendes Pflanzenmaterial angewiesen ist, ist nicht auszuschließen, dass auch er auf solche „pathogenitätsunterdrückende“ Gene im Genom angewiesen ist, um seinem Lebensstil gerecht zu werden.

### **3.5 Um11464 bedingt eine veränderte Pflanzenreaktion**

Um die Auswirkung von Um11464 auf die pflanzliche Genexpression genauer zu untersuchen, wurden vergleichende Mais-Transkriptomanalysen 12 Stunden nach *U. maydis*-Infektion mittels RNASeq-Analysen durchgeführt. Während dieses frühen

Zeitpunktes haben bereits die Mehrheit aller *U. maydis* Zellen Filamente gebildet und beginnen mit der Initiation der Appressorienbildung. In dieser Phase erfolgt die PAMP-vermittelte Erkennung durch die Pflanze (Doehlemann *et al.*, 2008). Bei der für *U. maydis* erstmals durchgeführten Methodik ergab sich das Problem, dass die Sequenzierungstiefe unzureichend war, weshalb auf pflanzlicher Seite unter Verwendung adäquater Analysemethoden nur wenige differenziell regulierte Gene detektiert werden konnten. Nichts desto trotz wurde beobachtet, dass 12 Stunden nach SG200-Infektion Gene mit Funktion in Abwehr und Redoxregulation induziert wurden. Dies steht im Einklang mit früheren Mais-Transkriptomanalysen, in denen SG200 12 Stunden nach Infektion eine PAMP-vermittelte Abwehrreaktion induzierte (Doehlemann *et al.*, 2008). Eine solche Abwehrreaktion wird bereits 24 Stunden nach *U. maydis*-Infektion erfolgreich unterdrückt und gewährleistet die Etablierung einer kompatiblen Interaktion (Doehlemann *et al.*, 2008). Eine zu SG200 vergleichbare PAMP-vermittelte Abwehrreaktion konnte auch nach Infektion mit SG200 $\Delta$ um11464 beobachtet werden. So wurde beispielsweise auch nach SG200 $\Delta$ um11464-Infektionen eine Induktion von Genen mit Funktion in Redoxregulation (GRMZM2G050234) detektiert. Außerdem wurden Protease-Inhibitoren wie etwa ein Bowman-Birk Trypsin Inhibitor (GRMZM2G114552) differenziell hochreguliert. Ein hochreguliertes Gen mit Peroxidase-Aktivität (GRMZM2G382379) könnte auf die Erkennung der *um11464* Mutante und eine daraus resultierende basale Abwehrreaktion durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies hindeuten. Des Weiteren wurde das Calcium-bindende Protein CCD1 (AC225718.2\_FG006) und ein WRKY Transkriptionsfaktor (GRMZM2G025895) differenziell hochreguliert. Während die Expression Calcium-bindender Proteine eine mögliche Abwehrfunktion gegenüber pathogener Organismen darstellen könnte, werden WRKY Transkriptionsfaktoren vermehrt als Reaktion auf Verletzungen induziert (Cheong *et al.*, 2002). Ein deutlicher Unterschied zu SG200 zeigte sich hingegen durch die vermehrte Hochregulation von Genen mit Funktion in Zellwandmetabolismus. Nach SG200 $\Delta$ um11464-Infektion wurde eine Glykosyltransferase (GRMZM2G076307), eine Pektinesterase (GRMZM2G119864) sowie eine Cellulose-Synthase (GRMZM2G339645) differenziell hochreguliert. Die differenzielle Expression der erwähnten Gene mit Funktion in Zellwandmetabolismus könnten als Reaktion auf Verletzungen des pflanzlichen Gewebes betrachtet werden. Eine solche Verletzung könnte unter anderem auf den Infektionsprozess als solchen zurückgeführt werden. Allerdings wurde die Genexpression durch mit Wasser infizierte Pflanzen normalisiert. Es ist daher davon auszugehen, dass die erhöhte Expression der

„verletzungsinduzierten“ Gene direkt durch die *um11464* Deletion bedingt wurde. Unter anderem wäre es denkbar, dass die vermehrte Appressorienbildung der *um11464* Deletionsmutante zu einer vermehrten Bildung von Penetrationsstellen, d.h. Verletzungen, geführt hat.

Eine Form der pflanzlichen Abwehr ist die Induktion von Transkriptionsfaktoren, welche die Expression Stress-induzierter Gene regulieren. Frühere Studien zeigten, dass die differenzielle Regulation von Transkriptionsfaktoren in Mais erst 24 Stunden nach SG200-Infektion einsetzt (Doehlemann *et al.*, 2008). Es ist daher besonders auffällig, dass in dieser RNASeq-Analyse viele Gene mit DNA und RNA-bindender Funktion bereits während dieser frühen Infektionsphase differenziell reguliert wurden. Im Vergleich zu SG200, nach dessen Infektion keine Regulation von Transkriptionsfaktoren beobachtet werden konnte, wurden als Reaktion auf die *um11464* Deletion zahlreiche Transkriptionsfaktoren mit Zinkfinger-Motiven (GRMZM2G436344, GRMZM2G703442) oder PPR-Domänen (GRMZM2G021303, GRMZM2G349193) differenziell herunterreguliert. Mit einer Calcineurin B-Protein bindenden Proteinkinase (CIPK) (GRMZM2G181081) wurde zudem ein Gen differenziell herunterreguliert, das entscheidend an der Signalweiterleitung in Pflanze als Reaktion auf eine erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beteiligt ist. Im Vergleich zu SG200 wird somit eine Vielzahl an Genen, die wesentlich an der pflanzlichen Abwehrreaktion gegenüber pathogener Organismen beteiligt sind, infolge der *um11464* Deletion herunterreguliert. Dies lässt vermuten, dass eine pflanzliche Abwehrreaktion nach Verlust des *um11464* Gens verstärkt unterdrückt wird, was eine Elicitorfunktion des Um11464 Proteins bekräftigt und eine direkte Beteiligung von Um11464 an der Virulenz von *U. maydis* unterstreicht. In Kombination mit der bereits erwähnten, signifikant erhöhten Appressorienbildung der *um11464* Mutante, welche die Kolonisation des Pflanzengewebes erleichtert, ist es denkbar, dass die verstärkte Unterdrückung pflanzlicher Abwehrmechanismen nach *um11464* Deletion einen hypervirulenten Phänotyp in Pflanze begünstigt. Allerdings müssen die Ergebnisse der RNASeq-Analyse mit Vorbehalt betrachtet werden, denn wie schon erwähnt schien die Sequenzierungstiefe nicht ausreichend genug gewesen zu sein, um statistisch abgesicherte Aussagen zu machen. Außerdem wurde während der statistischen Analyse festgestellt, dass eine sehr starke Varianz der Gen-Expressionswerte zwischen den drei biologischen Replikaten vorlag. Dies konnte auch in einer qPCR-Analyse anhand ausgewählter Maisgene bestätigt werden und scheint auf eine unzureichende Synchronisierung der Infektions- und

Wachstumsbedingungen zwischen den einzelnen Replikaten zurückzuführen sein. Schwankungen zwischen biologischen Replikaten sind ein grundlegendes Problem für die Datenanalyse mittels statistischer Analyseprogramme, da es passieren kann, dass dadurch eine wesentlich geringere Menge differenziell regulierter Gene detektiert wird oder aber mehr falsch-positive Kandidaten detektiert werden (Anders und Huber, 2010; Tarazona *et al.*, 2011; Trapnell *et al.*, 2012). Dies wiederum bedingt, dass gewisse biologische Zusammenhänge möglicherweise nicht richtig gedeutet werden können.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material und Bezugsquellen

#### 4.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren von der Qualität *p. a.* und wurden vorwiegend von den Firmen Difco (Augsburg), Fluka (Buchs/Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

#### 4.1.2 Puffer und Lösungen

Standardpuffer und -lösungen wurden nach Ausubel *et al.* (1987) und Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Spezielle Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt. Alle Medien, Lösungen und Puffer wurden, soweit notwendig, vor Verwendung für 5 min bei 121°C autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden mit Hilfe eines Filteraufsatzes (Porengröße 0,2 µm; Merck, Darmstadt) sterilfiltriert.

#### 4.1.3 Enzyme und Antikörper

Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt) bezogen. Als DNA-Polymerasen wurden Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes/NEB, Frankfurt), KOD Extreme Polymerase (Novagen/Merck, Darmstadt), Taq DNA-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Roth) und Klenow-Fragment (NEB, Frankfurt) verwendet. Die Ligation von DNA-Molekülen wurde mit T4 DNA Ligase (Roche, Mannheim) durchgeführt. Für den enzymatischen Abbau von RNA wurde RNase A (Serva, Heidelberg) verwendet. Enzymatischer Abbau von Zellwänden erfolgte mittels Lysozym (Roche, Mannheim) und Novozym 234 (Novo Nordisc, Kopenhagen, Dänemark). Antikörper wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Roche (Mannheim), Cell Signaling Technology (Danver/USA), Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg), Calbiochem/Merck (Darmstadt) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Eine detaillierte Auflistung der Antikörper findet sich in Kapitel 4.6.4.3 (Tab. 7).

#### 4.1.4 Verwendete Kits

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen und zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Mannheim) verwendet. Für die Aufreinigung von Plasmiden wurde das QIAprep Spin MiniPrep Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Klonierung von PCR Produkten wurde unter Verwendung des TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Spezielle Kits sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

### 4.2 Zellkultivierung

#### 4.2.1 Kultivierung von *E.coli* und *A. tumefaciens*

Stämme von *E. coli* und *A. tumefaciens* wurden in dYT-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) bei 37°C (*E. coli*) bzw. 28°C (*A. tumefaciens*) und 200 Upm kultiviert. Zur Selektion wurden die Antibiotika Ampicillin (100 µg/ml), Kanamycin (50 µg/ml), Gentamycin (20 µg/ml), Tetrazyclin (25 µg/ml) bzw. Rifampicin (100 µg/ml) verwendet. Dauerkulturen wurden durch Zugabe von 25% (v/v) Glycerin hergestellt und bei -80°C gelagert.

dYT-Flüssigmedium (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	1,6% (w/v) Trypton-Pepton
	1,0% (w/v) Yeast Extract
	0,5% (w/v) NaCl
	in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>

YT- Festmedium	0,8% (w/v) Trypton-Pepton
	0,5% (w/v) Yeast Extract
	0,5% (w/v) NaCl
	1,3% (w/v) Bactoagar
	in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>

#### 4.2.2 Kultivierung von *U. maydis*

In dieser Arbeit verwendete *U. maydis* Kulturen wurden standardmäßig in YEPS<sub>L</sub>-Flüssigmedium bei 28°C und 200 Upm kultiviert. Für Festmedien wurden Potato-Dextrose-Agarplatten, gegebenenfalls mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen

Carboxin (5µg/ml), Hygromycin (200µg/ml) oder Nourseothricin (75µg/ml), verwendet. Die dauerhafte Lagerung von *U. maydis* Kulturen erfolgte bei -80°C unter Zugabe von 50% NSY-Glycerin zu einer dicht gewachsenen Kultur.

YEPS <sub>L</sub> (modifiziert nach Tsukuda <i>et al</i> , 1988)	1,0% (w/v) Hefeextrakt
	1,0% (w/v) Pepton
	1,0% (w/v) Saccharose
	in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
Potato-Dextrose-Agar (PD)	3,9% (w/v) Potato Dextrose Agar
	1,0% (v/v) Tris-HCl pH 8,0
	in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
PD-Aktivkohle	wie PD, jedoch zusätzlich
	1,0% (w/v) Aktivkohle
NSY-Glycerin	0,8% (w/v) Nutrient Broth
	0,1% (w/v) Hefeextrakt
	0,5% (w/v) Saccharose
	69,6% (v/v) Glycerin
	in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>

Für Stressmedien wurde Complete Medium (CM) verwendet, welches nach dem Autoklavieren mit Kongorot (70 µg/ml), Calcofluor white (50 µg/ml), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,5 mM), Sorbitol (2 M), NaCl (1 M), CaCl<sub>2</sub> (600 mM) bzw. EGTA (1 mM) versetzt wurde. Um auf Sensitivität gegen die jeweiligen Stressoren zu testen, wurden die Stämme in YEPS<sub>L</sub> zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 angezogen und in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf eine OD<sub>600</sub> von 1,0 eingestellt. Von diesen Zellsuspensionen wurden serielle Verdünnungen (1:10) hergestellt und je 7 µl dieser Suspensionen auf entsprechendes Festmedium getropft. Um auf filamentöses Wachstum zu testen, wurden Zellsuspensionen auf PD-Aktivkohle-Platten getropft. Kompatible Stämme wurden hierfür zuvor 1:1 gemischt.



CM-Flüssigmedium (Holliday, 1974)	0,15% (w/v) $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 0,25% (w/v) Casaminosäuren 0,05% (w/v) Heringsperma-DNA 0,1% (w/v) Hefeextrakt 1,0% (v/v) Vitaminlösung 6,25% (v/v) Salzlösung 1,0% (v/v) Tris-HCl pH 8,0 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$ ; pH 7,0 (mit NaOH) Nach dem Autoklavieren: 2,0% (v/v) Glukose
CM-Festmedium (Holliday, 1974)	wie CM-Flüssigmedium 2,0% (w/v) Bactoagar
Vitaminlösung (Holliday, 1974)	0,1‰ (w/v) Thiamin 0,05‰ (w/v) Riboflavin 0,05‰ (w/v) Pyridoxin 0,2‰ (w/v) Kalziumpantothenat 0,05‰ (w/v) para-Aminobenzoesäure 0,2‰ (w/v) Nikotinsäure 0,2‰ (w/v) Cholinchlorid 1,0‰ (w/v) myo-Inositol in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$ ; sterilfiltriert
Salzlösung (Holliday, 1974)	1,6% (w/v) $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,8% (w/v) KCl 0,4% (w/v) $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1% (w/v) $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,8% (v/v) Spurenelementlösung in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$
Spurenelementlösung	0,06‰ (w/v) $\text{H}_3\text{BO}_3$ 0,14‰ (w/v) $\text{MnCl} \times 4\text{H}_2\text{O}$ 0,4‰ (w/v) $\text{ZnCl}_2$

0,4‰ (w/v)  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$   
0,1‰ (w/v)  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$   
0,03‰ (w/v)  $\text{CuSO}_4$   
in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$

Der *U. maydis* Stamm AB33 und dessen Derivate wurden in Nitrat-Minimalmedium (NM-MM) kultiviert, um den Nitrat-induzierbaren Promotor  $P_{\text{nar}}$  zu reprimieren bzw. zu induzieren.

NM-MM (Holliday, 1974)                      0,3% (w/v)  $\text{KNO}_3$   
6,25% (v/v) Salzlösung  
in  $\text{H}_2\text{O}$ ; pH 7,0 (mit NaOH)  
nach dem Autoklavieren:  
2,0% (v/v) Glukose

#### 4.2.3 Kultivierung von Hefen

*S. cerevisiae* wurde bei 28°C und 200 Upm aerob angezogen. Als Vollmedium diente YEPD-Medium. Für Stämme mit Auxotrophien wurde SD-Medium mit den entsprechenden Aminosäure-Supplementen eingesetzt. Für Dauerkulturen wurde 25% (v/v) Glycerin zu einer dicht gewachsenen Kultur gegeben. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

YPD-Medium                                      2,0% (w/v) Pepton (Difco)  
1,0% (w/v) Hefeextrakt  
5,5% (w/v) Adenin  
in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$   
Nach dem Autoklavieren:  
2,0% (v/v) Glucose  
[Festmedium: 2% (w/v) Bactoagar]

SD-Basismedium                                0,67% (w/v) Yeast Nitrogen Base w/o amino acids  
in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$   
Nach dem Autoklavieren:  
2,0% (v/v) Glucose

[Festmedium: 2% (w/v) Bactoagar]

Aminosäure-Supplemente	0,002% (w/v) L-Adenin Hemisulfat
	0,002% (w/v) L-Arginin HCl
	0,002% (w/v) L-Histidin HCl
	0,003% (w/v) L-Isoleucin
	0,01% (w/v) L-Leucin
	0,003% (w/v) L-Lysin HCl
	0,002% (w/v) L-Methionin
	0,005% (w/v) L-Phenylalanin
	0,02% (w/v) Threonin
	0,002% (w/v) L-Tryptophan
	0,003% (w/v) L-Tyrosin
	0,002% (w/v) L-Uracil
	0,015% (w/v) L-Valin

Die Kultivierung von *P. pastoris* wurde nach dem Invitrogen „EasySelect *Pichia* Expression Kit“ Handbuch in BMGY- und BMMY-Medium bei 28°C und 200 Upm durchgeführt. Die Stämme wurden hierzu vorerst hinsichtlich ihrer Fähigkeit auf Minimal Dextrose Medium (MDH) bzw. Minimal Methanol Medium (MMH) wachsen zu können, getestet.

MDH/MMH-Medium	1,34% Hefe-Extrakt
	4 x 10 <sup>-5</sup> % (w/v) Biotin
	0,004% Histidin
	2,0% (v/v) Dextrose (MDH) bzw.
	0,5% Methanol (MMH)
	[Festmedium: 2% (w/v) Bactoagar]

BMGY/BMMY-Medium	1,0% (w/v) Hefe-Extrakt
	2,0% (w/v) Pepton
	100 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6,0
	1,34% (w/v) Yeast Nitrogen Base w/o Aminosäuren

4 x 10<sup>-5</sup>% (w/v) Biotin

1,0% (v/v) Glycerin (BMGY) bzw.

0,5% (v/v) Methanol (BMMY)

#### 4.2.4 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem NovaspecII Gerät (Pharmacia Biotech/GE Lifesciences, München) bei 600 nm bestimmt. Zur Gewährleistung einer linearen Abhängigkeit wurden die Kulturen durch entsprechende Verdünnungen auf Werte unter 0,8 verdünnt. Als Referenzwert wurde die OD<sub>600</sub> des entsprechenden Kulturmediums verwendet.

### 4.3 Stämme, Oligonukleotide und Vektoren

#### 4.3.1 Mais- (*Zea mays* spec.) und Tabakvarietäten (*Nicotiana* spec.)

Für Pflanzeninfektionen wurde die Maisvarietät Early Golden Bantam (Olds Seed Company, Madison, Wisconsin, USA) verwendet.

Für die *A. tumefaciens*-vermittelte transiente Expression von Proteinen in Tabakpflanzen wurde ausschließlich die Varietät *Nicotiana benthamiana* verwendet.

#### 4.3.2 *E. coli* Stämme

Die in dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen *E. coli*-Standardstämme und deren Verwendung können Tab. 2 entnommen werden.

**Tab. 2: Verwendete *E. coli* Stämme**

Stamm [Genotyp]	Verwendung	Referenz
K-12 TOP10 [F <sup>-</sup> , mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ80lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL(StrR), endA1, nupG]	Plasmidamplifizierung/ Klonierung	Invitrogen
K-12 DH5α [F <sup>-</sup> Φ80d lacZ ΔM15 (lacZYAargF)]	Plasmidamplifizierung/ Klonierung	Invitrogen

---

<i>U169 deoR recA1 endA1 sdR17(rK-, mK+) phoA supE44 λ- thi-I gyr A96 relA1]</i>		
BL21 (DH3)pLysS	Proteinexpression	NEB
<i>[Dcm ompT hsdS (rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) gal λ(DE3) [pLysS Cam<sup>r</sup>]</i>	Gewährleistung hoher Proteinexpression durch das Fehlen der beiden Proteasen OmpT und Lon	
ArcticExpress (DE3)	Proteinexpression	Agilent Technologie
<i>[F<sup>-</sup> ompT hsdS(rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) dcm+ Tetr gal λ(DE3) endA Hte [cpn10 cpn60 Gentr]</i>	Ko-Expression der Kälte-adaptierten Chaperone Cpn10 und Cpn60 erleichtert Proteinfaltung und –stabilität und gewährleistet verbesserte Löslichkeit	

---

#### 4.3.3 *A. tumefaciens* Stämme

Für transiente Expression von Proteinen in *N. benthamina* wurde der *A. tumefaciens* Stamm GV3101 verwendet (Koncz und Schell, 1986). Dieser besitzt eine chromosomale Rif-Resistenz. Außerdem ist in dem Stamm das Ti-Plasmid pMP90 für die Expression der für den DNA-Transfer nötigen *vir*-Gene, jedoch mit einer ansonsten unfunktionellen T-DNA-Region, enthalten. Das Ti-Plasmid vermittelt Gen-Resistenz. Außerdem enthält der verwendete Stamm ein Ti-Helferplasmid, welches ein Tet-Resistenzgen trägt und *in trans* die Replikation der Plasmide in *A. tumefaciens* vermittelt.

#### 4.3.4 Hefe-Stämme

Für etwaige Analysen, die das Arbeiten mit einem Hefestamm abverlangten, wurde der Stamm AH109 (Clontech, Saint-Germain-en-Laye/Frankreich) mit dem Genotyp MATa, *trp1-901*, *leu2-3*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *LYS2::GAL1<sub>UAS</sub> -GAL1<sub>TATA</sub> -HIS3*, *GAL2<sub>UAS</sub> -GAL1<sub>TATA</sub> -ADE2*, *URA3::MEL1<sub>UAS</sub> -MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ* verwendet. Für die Hefesignalsequenzfalle (yeast signal sequence trap / YSST) wurde der Stamm Y02321 mit dem Genotyp MATa, *his3Δ1*, *leu2Δ0*, *met15Δ0*, *ura3Δ0*; *YIL162w::kanMX4* verwendet. Dieser wurde freundlicherweise von A. Hof zur Verfügung gestellt.

Für Um11464-Expressionsversuche wurde der *P. pastoris* Stamm GS115 [Mut<sup>+</sup>, His<sup>-</sup>] (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Als Kontrollstamm für sekretierte Proteinexpression diente der Stamm GS115 [Mut<sup>S</sup>, His<sup>+</sup>, Albumin] (Invitrogen, Karlsruhe).

### 4.3.5 *U. maydis* Stämme

In diesem Kapitel werden die verwendeten *U. maydis* Ausgangsstämme (Tab. 3) sowie die in dieser Arbeit eigens generierten Stämme (Tab. 4) aufgeführt.

Bei der Herstellung von Deletionsmutanten wurde das jeweilige Gen nach Kämper *et al.*, 2004 und Brachmann *et al.*, 2004 durch eine Resistenzkassette ersetzt. Dabei wurden Plasmide, welche ein Carboxin-resistentes *ip*-Allel (*ip*<sup>R</sup>) tragen (Broomfield und Hargreaves, 1992) und für die Integration der Gene in den *ip*-Lokus verwendet werden, über homologe Rekombination mit dem endogenen, Carboxin-sensitiven *ip*-Allel (*ip*<sup>S</sup>) in das Genom von *U. maydis* eingebracht. Alle Stämme wurden über Southern-Blot Analysen bestätigt. In Einzelfällen wurden Plasmidintegrationen in den *ip*-Lokus mittels PCR-Analysen bestätigt. Wenn nicht anders vermerkt, handelt es sich bei den Plasmidintegrationen in den *ip*-Lokus um Einzelintegrationen.

**Tab. 3: *U. maydis* Ausgangsstämme**

Name	Genotyp	Resistenz <sup>1</sup>	Referenz
SG200	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i>	P	Kämper <i>et al.</i> , 2006
CL13	<i>a1 bE1 bW2</i>	-	Bölker <i>et al.</i> , 1995
FB1	<i>a1b1</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
FB2	<i>a2b2</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
FB1Δ <i>hum3Δrep1</i>	<i>a1b1</i> Δ <i>hum3Δrep1</i>	H, N	Müller <i>et al.</i> , 2008
FB2Δ <i>hum3Δrep1</i>	<i>a2b2</i> Δ <i>hum3Δrep1</i>	H, N	Müller <i>et al.</i> , 2008
AB33	<i>a2 Pnar:bW2, bE1</i>	P	Brachmann <i>et al.</i> , 2001
SG200AM1	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> <i>ip</i> <sup>R</sup> [ <i>Pum01779:3eGFP</i> ] <i>ip</i> <sup>S</sup>	P, C	Mendoza-Mendoza <i>et al.</i> , 2009
SG200-mCherry-HA	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> <i>ip</i> <sup>R</sup> [ <i>Potef:mcherry:ha</i> ] <i>ip</i> <sup>S</sup>	P, C	Stefanie Reißmann, MPI

<sup>1</sup>Phleomycin (P), Hygromycin (H), Carboxyin (C), Nourseothricin (N)

**Tab. 4: In dieser Arbeit hergestellte *U. maydis* Stämme**

Stamm	Genotyp	Resistenz <sup>1</sup>
SG200Δum11464	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum11464	P, H
SG200Δum11464-11464	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum11464 <i>ip<sup>R</sup>[P<sub>um11464</sub>:11464]ip<sup>S</sup></i>	P, H, C
SG200Δum11464- 11464HA	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum11464 <i>ip<sup>R</sup>[P<sub>um11464</sub>:11464:ha]ip<sup>S</sup></i>	P, H, C
SG200Δum11464- P <sub>otef</sub> 11464HA	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum11464 <i>ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:11464:ha]ip<sup>S</sup></i>	P, H, C
SG200Δum11464-11464- mCherryHA	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum11464 <i>ip<sup>R</sup>[P<sub>um11464</sub>:11464:mcherry:ha]ip<sup>S</sup></i>	P, H, C
SG200Δum11464- P <sub>otef</sub> 11464-mCherryHA	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum11464 <i>ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:11464:mcherry:ha]ip<sup>S</sup></i>	P, H, C
SG200Δum11464-P <sub>otef</sub> - mCherryHA-um11464	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum11464 <i>ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:SPmcherryha:11464:ha]ip<sup>S</sup></i>	P, H, C
SG200Δum11464- P <sub>cmul</sub> 11464HA	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum11464 <i>ip<sup>R</sup>[P<sub>cmul</sub>:11464:ha]ip<sup>S</sup></i>	P, H, C
SG200Δum11464- P <sub>oma</sub> 11464-StrepHA	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum11464 <i>ip<sup>R</sup>[P<sub>oma</sub>:11464:strep:ha]ip<sup>S</sup></i>	P, H, C
SG200Δum11464- sr13312 <sup>2</sup>	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum11464 <i>ip<sup>R</sup>[P<sub>sr13312</sub>:sr13312]ip<sup>S</sup></i>	P, H, C
SG200Δum11464- 11464 <sup>Δ1-21</sup> -HA	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum11464 <i>ip<sup>R</sup>[P<sub>um11464</sub>:11464<sup>Δ1-21</sup>:ha]ip<sup>S</sup></i>	P, H, C
SG200Δum11464- 11464 <sup>Δ1-21</sup> -SP <sub>cmul</sub> -HA	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum11464 <i>ip<sup>R</sup>[P<sub>um11464</sub>:11464<sup>Δ1-21</sup>:SP<sub>cmul</sub>:ha]ip<sup>S</sup></i>	P, H, C
SG200Δum11464-P <sub>otef</sub> - SP-GFPHA-11464 <sup>Δ21-181</sup>	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum11464 <i>ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:egfp:ha:um11464<sup>Δ21-181</sup>]ip<sup>S</sup></i>	P, H, C
CL13Δum11464	<i>a1 bE1 bW2</i> Δum11464	H
CL13Δum11464- 11464HA	<i>a1 bE1 bW2</i> Δum11464 <i>ip<sup>R</sup>[P<sub>um11464</sub>:11464:ha]ip<sup>S</sup></i>	H, C
CL13Δum11464- 11464 <sup>Δ165-316</sup> -HA	<i>a1 bE1 bW2</i> Δum11464 <i>ip<sup>R</sup>[P<sub>um11464</sub>:11464<sup>Δ165-316</sup>:ha]ip<sup>S</sup></i>	H, C
CL13Δum11464-	<i>a1 bE1 bW2</i>	H, C

11464 <sup>Δ21-152</sup> -HA	$\Delta um11464\ ip^R[P_{um11464}:11464^{\Delta21-152}:ha]ip^S$	
CL13 $\Delta um11464$ -	<i>a1 bE1 bW2</i>	H, C
11464 <sup>Δ32-132</sup> -HA	$\Delta um11464\ ip^R[P_{um11464}:11464^{\Delta32-132}:ha]ip^S$	
CL13 $\Delta um11464$ -	<i>a1 bE1 bW2</i>	H, C
11464 <sup>Δ210-316</sup> -HA	$\Delta um11464\ ip^R[P_{um11464}:11464^{\Delta210-316}:ha]ip^S$	
CL13 $\Delta um11464$ -	<i>a1 bE1 bW2</i>	H, C
11464 <sup>Δ241-316</sup> -HA	$\Delta um11464\ ip^R[P_{um11464}:11464^{\Delta241-316}:ha]ip^S$	
CL13 $\Delta um11464$ -	<i>a1 bE1 bW2</i>	H, C
11464 <sup>Δ295-316</sup> -HA	$\Delta um11464\ ip^R[P_{um11464}:11464^{\Delta295-316}:ha]ip^S$	
AB33-um11464HA	<i>a2 Pnar:bW2, bE1</i> $ip^R[P_{um11464}:11464:ha]ip^S$	P, C
FB1 $\Delta um11464$	<i>a1b1 Δum11464</i>	H

<sup>1</sup> Phleomycin (P), Hygromycin (H), Carboxyin (C), Nourseothricin (N)

<sup>2</sup> Verifizierung der Plasmidintegration in den *ip*-Lokus mittels PCR-Analyse

#### 4.3.6 Oligonukleotide

Tab. 5 weist alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide auf, welche zur Herstellung bzw. Sequenzierung von Plasmiden sowie für quantitative „real-time“ PCR verwendet wurden. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert.

**Tab. 5: Verwendete Oligonukleotide**

Name	Sequenz 5'→3'	Beschreibung <sup>1</sup>
oNS1	GATCGGCCATCTAGGCCAGAGCAGCGCCA AAACGTG	Amplifiziert die 5'-Flanke des Deletionskonstrukts $\Delta um11464$ ; führt <i>Sfi</i> I-Schnittstelle ein [R]
oNS2	GTGTATACGAGACTGCCTCG	Amplifiziert die 5'-Flanke des Deletionskonstrukts $\Delta um11464$ [F]
oNS3	GATCGGCCTGAGTGGCCTTGCTCTGTTTTGC TTGTCC	Amplifiziert die 3'-Flanke des Deletionskonstrukts $\Delta um11464$ ; führt <i>Sfi</i> I-Schnittstelle ein [F]
oNS4	ATGATATGCTGAGGCTGAGC	Amplifiziert die 3'-Flanke des Deletionskonstrukts $\Delta um11464$ [R]
oNS10	GATCAAGCTTGTGTATACGAGACTGCCTCG	Amplifiziert <i>um11464</i> mit einem 1,0 kb-Promotorbereich; führt eine <i>Hind</i> III-Schnittstelle ein [F]



oNS11	GATCGCGGCCGCCAGCACACTAGACTTGCA GA	Amplifiziert <i>um11464</i> mit dem 1,0- bzw. 1,5 kb-Promotorbereich; führt eine <i>NotI</i> -Schnittstelle ein [R]
oNS14	TTGTCAGTGCTGCTATCAGC	Amplifiziert einen Teil von <i>um11464</i> für Test-PCR [F]
oNS15	CTCTAGCAGCCTTAACATCG	Amplifiziert einen Teil von <i>um11464</i> für Test-PCR [R]
oNS16	GGACATATTGTCGTTAGAACGCG	Sequenzierung; hybridisiert mit <i>um11464</i> -Promotorbereich [F]
oNS17	GACGAACTCTGTGACTTCTG	Sequenzierung; hybridisiert mit <i>um11464</i> -Promotorbereich [F]
oNS18	TCCAGCACACTTTCTCTTGC	Sequenzierung; hybridisiert mit <i>um11464</i> -Promotorbereich [F]
oNS19	GACCGGCAACAGGATTCAATC	Sequenzierung; hybridisiert mit <i>nos</i> Terminator [R]
oNS23	GCACAATGCAGACTCGCTTC	Sequenzierung; hybridisiert mit <i>um11464</i> [F]
oNS24	GATCCCATGGGGGGGGTGGCGATCGAGC GAGGGGTATGCGATCTCTGAT	Amplifiziert <i>um11464</i> und führt zur 3'-Fusion mit einem RSIAT-Linker; führt eine <i>NcoI</i> -Schnittstelle ein [R]
oNS25	GTCCCCGACTATGCCTGAGAATCTTTATTC TTTGCTCT	Inverse PCR zur 3'-Fusion von <i>um11464</i> mit einem <i>ha</i> -Epitop; enthält die 3'-Hälfte von <i>ha</i> [F]
oNS26	GTCGTAGGGATAGCCGCCCGAAGGGGTAT GCGATCTCTGAT	Inverse PCR zur 3'-Fusion von <i>um11464</i> mit einem <i>ha</i> -Epitop; enthält die 5'-Hälfte von <i>ha</i> [R]
oNS33	CTCGGCTCGAATCATACC	Für qRT-PCR verwendet; amplifiziert <i>um11464</i> [F]
oNS34	GATACGAGCGAGACGAAAG	Für qRT-PCR verwendet; amplifiziert <i>um11464</i> [R]
oNS42	ATAGGCCTGAGTGGCCGATCGTCTTTGCAC GTTTTG	Amplifiziert <i>um11464</i> ; führt eine <i>SfiI</i> -Schnittstelle am 5'-Ende ein [F]
oNS43	ATAGGCCTGAGTGGCCTGAGCACGTGTGGA TCTCTGG	Amplifiziert den 1,0 kb-Promotorbereich von <i>um11464</i> ; führt eine <i>SfiI</i> -Schnittstelle ein [F]
oNS44	TATGGCCGCGTTGGCCTGCGATCTCTGATG ATACGAG	Amplifiziert <i>um11464</i> ; führt eine <i>SfiI</i> -Schnittstelle am 3'-Ende ein [R]
oNS52	ACGGGTGCACGCGGTGTTG	Inverse PCR zur Deletion beider LysM-Domänen ( $\Delta 32-132$ aa) [R]

oNS53	GCCGGAAGCATTCGTCCTC	Inverse PCR zur Deletion beider LysM-Domänen ( $\Delta 32-132$ aa) [F]
oNS59	GATC <u>G</u> GATCCATGCGCGCCTTGTCAGTGC	Amplifiziert <i>um11464</i> für die Insertion in den Vektor pAH-01; führt eine <i>Bam</i> HI-Schnittstelle ein [F]
oNS60	GATC <u>GCGGCCG</u> CTCAGGCATAGTCGGGGA CG	Amplifiziert <i>um11464</i> für die Insertion in den Vektor pAH-01; führt eine <i>Not</i> I-Schnittstelle ein [R]
oNS67	AGTCAGGCCTTCCACTCGAACAACAC	Amplifiziert <i>um11464</i> ohne SP für die Insertion in den Vektor pET SUMO [F]
oNS68	GATCTCAGGCATAGTCGGGGACGTCGTAGG	Amplifiziert <i>um11464</i> ohne SP für die Insertion in den Vektor pET SUMO [R]
oNS75	AGATC <u>G</u> GATCCTCGGGCGGCTATCCCTACG AC	Inverse PCR zur Deletion des C-terminalen Bereichs ( $\Delta 165-316$ aa) von <i>um11464</i> ; führt eine <i>Bam</i> HI-Schnittstelle ein [F]
oNS76	GATCCTGCTTGGTGAGCCACATCTG	Inverse PCR zur Deletion des C-terminalen Bereichs ( $\Delta 165-316$ aa) von <i>um11464</i> [R]
oNS85	GATG <u>G</u> AATTCGCCTTCCACTCGAACAACAC	Amplifiziert <i>um11464</i> ohne SP für die Insertion in den Vektor pPICZ $\alpha$ A; führt eine <i>Eco</i> RI-Schnittstelle ein [F]
oNS86	GATAG <u>C</u> GCGCCGCAGGGGTATGCGATCTCT GATG	Amplifiziert <i>um11464</i> ohne SP für die Insertion in den Vektor pPICZ $\alpha$ A; führt eine <i>Not</i> I-Schnittstelle ein [R]
oNS95	GACGTCCCCGACTATGCCTTCCACTCGAAC AACACCG	Inverse PCR zum Einbringen eines <i>ha</i> -Epitops nach dem SP von <i>um11464</i> ; enthält die 3'-Hälfte von <i>ha</i> [F]
oNS96	GTAGGGATAGCCGCCCCGAGGCGGCTCGCG TGAGCAGCG	Inverse PCR zum Einbringen eines <i>ha</i> -Epitops nach dem SP von <i>um11464</i> ; enthält die 5'-Hälfte von <i>ha</i> [R]
oNS101	GATCGAATTCATGCGCGCCTTGTCAGTGC	Amplifiziert eine C-terminal verkürzte Version von <i>um11464</i> für die Insertion in den Vektor pYST-O; führt eine <i>Eco</i> RI-Schnittstelle ein [F]
oNS102	GATAGCGGCCGCAGTTGAAGGCGAGGATC	Amplifiziert eine C-terminal verkürzte Version von <i>um11464</i>

		für die Insertion in den Vektor pYST-O; führt eine <i>NotI</i> -Schnittstelle ein [R]
oNS105	GATCGCGGCCGCAAGGGGTATGCGATCTCTG	Amplifiziert das Volllänge-Gen <i>um11464</i> für die Insertion in den Vektor pYST-O; führt eine <i>NotI</i> -Schnittstelle ein [R]
oNS120	GATAGGATCCGGGCTCGCGTGAGCAGCGGTAG	Inverse PCR zur Deletion des N-terminalen Bereichs von <i>um11464</i> ( $\Delta 21-152$ aa); führt eine <i>Bam</i> HI-Schnittstelle ein [R]
oNS131	GATAGCTAGAGAGAAGGCCCGGC	Inverse PCR zur Deletion des N-terminalen Bereichs von <i>um11464</i> ( $\Delta 21-152$ aa) [F]
oNS133	GATCGTGATGCTTGTCAGCGTGTG	Inverse PCR zur Verkürzung des C-Terminus von <i>um11464</i> ( $\Delta 210-316$ aa) [R]
oNS134	GATCTGGTGAGGGTGATTTCTCAAC	Inverse PCR zur Verkürzung des C-Terminus von <i>um11464</i> ( $\Delta 241-316$ aa) [R]
oNS136	GATCATGGGTGCCAGCCAGTGGCG	Inverse PCR zur Verkürzung des C-Terminus von <i>um11464</i> ( $\Delta 295-316$ aa) [R]
oNS137	GATCGGGCGGCTATCCCTACGACG	Inverse PCR zur Verkürzung des C-Terminus von <i>um11464</i> [F]
oNS138	GATCCAGCTGAGAGAGTCGCCGTCAATGAC	Amplifiziert das <i>S. reilianum</i> -Gen <i>sr13312</i> ; führt eine <i>Pvu</i> II-Schnittstelle ein [F]
oNS139	GATCGCGGCCGCTCAAGGGGTATGTGATCTCTG	Amplifiziert das <i>S. reilianum</i> -Gen <i>sr13312</i> ; führt eine <i>NotI</i> -Schnittstelle ein [R]
oNS140	GATCCATATGCCTATGGGGTTGATTCGAGAG	Amplifiziert den <i>cmul</i> -Promotor; führt eine <i>Nde</i> I-Schnittstelle ein [F]
oNS141	GATCGGATCCAGTAACCTAGAGCTCTTGCA G	Amplifiziert den <i>cmul</i> -Promotor; führt eine <i>Bam</i> HI-Schnittstelle ein [R]
oNS150	GCCTTCCACTCGAACAACACCG	Inverse PCR zum Entfernen des Signalpeptids von <i>um11464</i> [F]
oNS151	CATGATGGAAGCCAGAGCAGCGCC	Inverse PCR zum Entfernen des Signalpeptids von <i>um11464</i> [R]
oNS152	CTGGCGGTGTCGGCGTTCGGTGGTGGCAGCGCGCCTTCCACTCGAACAACAC	Inverse PCR zum Ersetzen des Signalpeptids von <i>um11464</i> durch das von <i>cmul</i> ; enthält die 3'-Hälfte des <i>cmul</i> -Signalpeptids

		[F]
oNS153	CAGCACAAAGATGGACACGCTCAACTTCAT GATGGAAGCCAGAGCAGCGCC	Inverse PCR zum Ersetzen des Signalpeptids von <i>um11464</i> durch das von <i>cmul</i> ; enthält die 5'-Hälfte des <i>cmul</i> -Signalpeptids [R]
oNS163	GATCGGGGCCCATGTGGTCGCACCCGCAGT TCGAGAAGGCCGCCTTCCACTCGAACAACA C	Amplifiziert <i>um11464</i> ohne Signalpeptid zur Insertion in den Vektor pBIN19AN; führt zur 5'-Fusion mit einem <i>Strep</i> -Epitop und führt eine <i>Apal</i> -Schnittstelle ein [F]
oNS164	GATCGCGGCCGCTTAAGGGGTATGCGATCT CTGATG	Amplifiziert <i>um11464</i> ; fügt ein Stopp-Codon am 3'-Ende sowie eine <i>NotI</i> -Schnittstelle ein [R]
oNS165	GATCCCATGGATGGTGAGCAAGGGCGAG GAG	Amplifiziert <i>mCherry</i> ; führt eine <i>NcoI</i> -Schnittstelle ein [F]
oNS166	GATCCCATGGAGCGTAATCTGGAACATCG	Amplifiziert <i>mCherry</i> ; führt eine <i>NcoI</i> -Schnittstelle ein [R]
oNS167	CCATGGGCCCTTCCACTCGAACAACAC	Inverse PCR zur Integration einer <i>NcoI</i> -Schnittstelle nach dem Signalpeptid von <i>um11464</i> [F]
oNS168	GGCTCGCGTGAGCAGCGGTAG	Inverse PCR zur Integration einer <i>NcoI</i> -Schnittstelle nach dem Signalpeptid von <i>um11464</i> [R]
oNS169_2	CCATGGGGCTCGCGTGAGCAGCGGTAG	Inverse PCR zur Deletion der Aminosäuren 22-181 von <i>um11464</i> ; führt eine <i>NcoI</i> -Schnittstelle ein [R]
oNS170	CCATGGCACCAAGATCAACAACCGCCAC	Inverse PCR zur Deletion der Aminosäuren 22-181 von <i>um11464</i> ; führt eine <i>NcoI</i> -Schnittstelle ein [F]
oNS171_2	GATTCCATGGGACATGGTGAGCAAGGGCG AGGAG	Amplifiziert <i>GFP-HA</i> ; führt eine <i>NcoI</i> -Schnittstelle ein [F]
oNS172	GATTCCATGGGGCATAGTCGGGGACGTCTG TAG	Amplifiziert <i>GFP-HA</i> ; führt eine <i>NcoI</i> -Schnittstelle ein [R]
oDL108	CCTCGATCTCGAACTCGTGGC	Sequenzierung; hybridisiert mit 3'-Ende von <i>mcherry</i> [R]
oDL110	GTGCCAGACTTTGTGTGTGCG	Sequenzierung; hybridisiert mit 3'-Ende des <i>otef</i> -Promotors [F]
GAPDH-RT-	CTTCGGCATTGTTGAGGGTTTG	Für qPCR; amplifiziert <i>GAPDH</i>

fw		aus <i>Z. mays</i> [F]
GAPDH-RT- rv	TCCTTGGCTGAGGGTCCGTC	Für qPCR; amplifiziert <i>GAPDH</i> aus <i>Z. mays</i> [R]
mfa1-RT-fw	GCTTTCGATCTTCGCTCAGAC	Für qPCR; amplifiziert <i>mfa1</i> aus <i>U. maydis</i> [F]
mfa1-RT-rv	CAACAACACAGCTGGAGTAGC	Für qPCR; amplifiziert <i>mfa1</i> aus <i>U. maydis</i> [R]
ppi-RT-fw	ACATCGTCAAGGCTATCG	Für qPCR; amplifiziert <i>ppi</i> aus <i>U. maydis</i> [F]
ppi-RT-rv	AAAGAACACCGGACTTGG	Für qPCR; amplifiziert <i>ppi</i> aus <i>U. maydis</i> [R]

<sup>1</sup>Das Oligonukleotid hybridisiert entweder mit dem *sense*-Strang [F] oder mit dem komplementären Strang [R] des jeweiligen Gens

#### 4.3.7 Plasmide

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Plasmide beschrieben. Alle Plasmide wurden durch Restriktionsanalysen überprüft. Wurden Plasmidteile durch PCR amplifiziert, so wurde die Korrektheit der inserierten DNA-Sequenzen durch Sequenzierungen der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) abgesichert. Soweit nicht anders vermerkt, vermitteln die Plasmide Amp-Resistenz.

##### Plasmide zur Klonierung von PCR-Produkten

###### pH-FRT-WT

Dieses Plasmid ist ein Derivat von pBS-hhn (Kämper, 2004) und enthält das *hph* Gen unter Kontrolle des *hsp70* Promotors und *nos* Terminators. Die Hygromycin-Resistenzkassette kann mittels *Sfi*I herausgeschnitten und für Deletionskonstrukte verwendet werden.

###### pBS-Cbx+

Enthält die Carboxin-Resistenzkassette, welche mit *Sfi*I herausgeschnitten und für Deletionskonstrukte verwendet werden kann.

###### pCRII-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe)

Ein Plasmid zur Klonierung von PCR-Produkten mittels Topoisomerase-Aktivität. Das Plasmid kann für die Blau-Weiß-Selektion verwendet werden.

###### pCRII-TOPO-LB<sub>um11464</sub>-Hyg-RB<sub>um11464</sub> (diese Arbeit)

Für dieses Plasmid wurde die 1,0 kb 5'-Flanke von *um11464* mit den Primern oNS1

und oNS2, die entsprechende 1,0 kb 3'-Flanke mit den Primern oNS3 und oNS4 amplifiziert. Beide Fragmente wurden mit *Sfi*I geschnitten und mit der 1,0 kb Hyg-Resistenzkassette aus pH-FRT-WT ligiert. Das Ligationsprodukt wurde über durch Taq-Polymerase erzeugte A-Überhänge in das Plasmid pCRII-TOPO kloniert. Das integrierte Ligationsprodukt im Plasmid kann durch PCR mit den Primern oNS2 und oNS4 amplifiziert und für die Deletion von *um11464* in *U. maydis* benutzt werden.

#### pCRII-TOPO-sr13312 (diese Arbeit)

Ein pCRII-TOPO Derivat, welches das mittels PCR amplifizierte *S. reliaum* Gen *sr13312* inklusive dessen vorgeschalteten, etwa 1 kb-langen Promotorbereich enthält. *Sr13312* kann mittels *Pvu*II und *Not*I herausgeschnitten und für Komplementationszwecke verwendet werden.

### **Plasmide zur Generierung stabiler *U. maydis* Mutanten**

#### p123 (Aichinger *et al.*, 2003)

Enthält das *gfp* Gen unter der Kontrolle des *otef* Promotors und des *nos* Terminators. Das Plasmid kann im *cbx* Gen linearisiert und im *ip*-Lokus von *U. maydis* integriert werden.

#### pAM1 (Mendoza-Mendoza, 2009)

Enthält eine transkriptionelle Fusion des *um01779* Promotors an *3xgfp*. Diese Eigenschaft kann als Reporter für die

Bildung von Appressorien verwendet werden. Das Plasmid kann im *cbx* Gen linearisiert und im *ip*-Lokus integriert werden.

#### p123-P<sub>cmuI</sub>-vcp (Dr. A. Djamei, pers. Mitteilung)

Enthält das für einen sekretorischen Effektor codierende Gen *vcp1* unter Kontrolle des starken *cmuI* Promotors. Dieses Plasmid wurde als Matrize für die Amplifikation des *cmuI* Promotors verwendet.

#### pAH-01 (A. Hof, pers. Mitteilung)

Dieses Plasmid enthält das Gen *um01987* unter Kontrolle des starken *oma* Promotors. Es wurde als Matrize für die Amplifikation des *oma* Promotors verwendet.

#### pDL55-P<sub>otef</sub>-um11464-mCherryHA (diese Arbeit)

Dieses Plasmid wurde für Um11464-Lokalisierungsstudien verwendet. Der *um11464* ORF wurde mittels der Primer oNS42 und oNS44 amplifiziert, mit *Sfi*I geschnitten und in den Vektor pDL55, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Daniel Lanver, integriert. Dabei wurde das Gen unter die Kontrolle des konstitutiven *otef*-Promotors gestellt und am 3'-Ende mit *mcherryHA* fusioniert.

#### p123-P<sub>otef</sub>-um11464HA (diese Arbeit)

Der *um11464* ORF wurde mittels der Primer oNS59 und oNS11 amplifiziert, mit *Bam*HI und *Not*I geschnittenen und in den Vektor

p123 integriert. Das Gen wurde damit unter die Kontrolle des konstitutiven *otef*-Promotors gestellt. Der C-terminale HA-Tag wurde nachträglich über inverse PCR durch die Primer oNS25 und oNS26 eingebracht. Das Plasmid kann im *cbx* Gen linearisiert und im *ip*-Lokus integriert werden.

#### p123-P<sub>um11464</sub>-um11464 (diese Arbeit)

Dieses Plasmid wurde für die Komplementation von SG200Δ<sub>um11464</sub> verwendet. Der *um11464* ORF mit der vorgeschalteten, etwa 1,0 kb-langen Promotorregion wurde mittels der Primer oNS10 und oNS11 amplifiziert, mit *HindIII* und *NotI* geschnittenen und in den Vektor p123 integriert, wobei sowohl der dort enthaltene *otef* Promotor als auch das *egfp*-Gen deletiert wurden. Das Plasmid kann im *cbx* Gen linearisiert und im *ip*-Lokus integriert werden.

#### p123-P<sub>um11464</sub>-um11464HA (diese Arbeit)

Als Matrize für dieses Plasmid galt p123-P<sub>um11464</sub>-um11464. Der C-terminale HA-Tag wurde nachträglich über inverse PCR durch die Primer oNS25 und oNS26 eingebracht.

#### p123-P<sub>um11464</sub>-um11464<sup>Δ32-132</sup>HA (diese Arbeit)

Dieses Plasmid entstand durch inverse PCR, wobei das Plasmid p123-P<sub>um11464</sub>-um11464HA als Matrize diente. Die für die Aminosäuren 32 - 132 von *um11464* kodierenden Basenpaare wurden dabei durch die Primer oNS52 und oNS53 deletiert.

#### p123-P<sub>um11464</sub>-um11464<sup>Δ21-151</sup>HA (diese Arbeit)

Dieses Plasmid entstand durch inverse PCR, wobei das Plasmid p123-P<sub>um11464</sub>-um11464HA als Matrize diente. Die für die Aminosäuren 21 - 151 von *um11464* kodierenden Basenpaare wurden dabei durch die Primer oNS120 und oNS131 deletiert.

#### p123-P<sub>um11464</sub>-11464<sup>Δ165-316</sup>HA (diese Arbeit)

Dieses Plasmid entstand durch inverse PCR, wobei das Plasmid p123-P<sub>um11464</sub>-um11464HA als Matrize diente. Die für die Aminosäuren 165-316 von *um11464* kodierenden Basenpaare wurden dabei durch die Primer oNS75 und oNS76 deletiert.

#### p123-P<sub>um11464</sub>-11464<sup>Δ295-316</sup>HA (diese Arbeit)

Dieses Plasmid entstand durch inverse PCR, wobei das Plasmid p123-P<sub>um11464</sub>-um11464HA als Matrize diente. Die für die Aminosäuren 295-316 von *um11464* kodierenden Basenpaare wurden dabei durch die Primer oNS136 und oNS137 deletiert.

#### p123-P<sub>um11464</sub>-11464<sup>Δ241-316</sup>HA (diese Arbeit)

Dieses Plasmid entstand durch inverse PCR, wobei das Plasmid p123-P<sub>um11464</sub>-um11464HA als Matrize diente. Die für die Aminosäuren 241-316 von *um11464* kodierenden Basenpaare wurden dabei durch die Primer oNS134 und oNS137 deletiert.

### p123-P<sub>um11464</sub>-11464<sup>Δ210-316</sup>HA (diese Arbeit)

Dieses Plasmid entstand durch inverse PCR, wobei das Plasmid p123-P<sub>um11464</sub>-um11464HA als Matrize diente. Die für die Aminosäuren 210-316 von *um11464* kodierenden Basenpaare wurden dabei durch die Primer oNS133 und oNS137 deletiert.

### P123-P<sub>um11464</sub>-11464<sup>Δ1-20</sup>

Das Signalpeptid von *um11464* wurde durch inverse PCR mit den Primern oNS150 und oNS151 entfernt. Als Matrize diente p123-P<sub>um11464</sub>-11464HA.

### P123-P<sub>um11464</sub>-11464<sup>Δ1-20</sup>-SP<sub>cmuI</sub>

Das Signalpeptid von *um11464* wurde über inverse PCR mit den Primern oNS152 und oNS153 durch das Signalpeptid von *cmuI* substituiert. Als Matrize diente p123-P<sub>um11464</sub>-11464HA.

### p123-P<sub>cmuI</sub>-um11464HA (diese Arbeit)

Der *cmuI* Promotor wurde unter Verwendung der Primer oNS140 und oNS141 amplifiziert, mit *NdeI* und *BamHI* geschnitten und in den Vektor p123-P<sub>otef</sub>-um11464HA integriert. Dadurch wurde der *otef* Promotor durch den *cmuI* Promotor ersetzt.

### p123-SP-mCherryHA-um11464HA

#### (diese Arbeit)

Das mCherryHA-Konstrukt wurde mittels der Primer oNS165 und oNS166 amplifiziert, mit *NcoI* geschnitten und in die Vektoren p123-P<sub>um11464</sub>-11464HA bzw. p123-P<sub>otef</sub>-

um11464HA, welchen zuvor eine *NcoI*-Schnittstelle über inverse PCR mit den Primern oNS167 und oNS168 eingefügt wurde, integriert.

### p123-SP-GFPHA-11464<sup>Δ21-181</sup> (diese Arbeit)

Das GFPHA-Konstrukt wurde mittels der Primer oNS171\_2 und oNS172 amplifiziert, mit *NcoI* geschnitten und in die Vektoren p123-P<sub>um11464</sub>-11464 bzw. p123-P<sub>otef</sub>-um11464HA integriert. In diesen wurde zuvor über inverse PCR mit den Primern oNS169\_2 und oNS170 der N-Terminus von *um11464* (Δ21-181 aa) durch eine *NcoI*-Schnittstelle ersetzt. Somit entstand ein sekretiertes GFPHA-Konstrukt, das der mikroskopischen Analyse einer GPI-Verankerung von *um11464* dienen sollte.

## **Plasmide zur Expression von Um11464 in *E. coli***

### pET SUMO (Invitrogen, Karlsruhe)

Leervektor für die Expression von Genen in *E. coli*. Der Vektor enthält einen T7lac-Promotor und wird für die Fusion von Genen an eine 6x-His-SUMO-Protein-Fusion am 5'-Ende verwendet. Das Plasmid vermittelt Kan-Resistenz.

### pET SUMO-um11464 (diese Arbeit)

Dieses Plasmid wurde generiert, um *um11464* periplasmatisch in *E. coli* zu exprimieren. Dabei wurde der *um11464* ORF ohne Signalpeptid über durch Taq-



Polymerase erzeugte A-Überhänge in den Vektor pET SUMO integriert. Am 5'-Ende ist das Gen mit einem 6x-His-SUMO-Protein, am 3'-Ende mit einem durch Amplifikation eingebrachtem HA-tag fusioniert. Das Plasmid vermittelt Kan-Resistenz.

### **Plasmide zur Expression von Um11464 in *P. pastoris***

#### pPICZ $\alpha$ A (Invitrogen, Karlsruhe)

Dieses Plasmid enthält eine 5' fusionierte Sequenz, die für das alpha-Sekretionssignal aus *P. pastoris* kodiert. Dieses soll der Sekretion des Proteins in das Kulturmedium dienen. Am 3'-Ende erfolgt die Fusion an einen *c-Myc*-Tag sowie einen 6x-His-Tag, welches der Aufreinigung und Detektion des Proteins dient. Die Proteinexpression steht unter der Kontrolle eines Methanol-induzierbaren Promotors.

#### pPICZ $\alpha$ A-um11464 $\Delta$ SP (diese Arbeit)

Zur Konstruktion dieses Plasmids wurde der *um11464* ORF ohne Signalpeptid über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *NotI* in das Plasmid pPICZ $\alpha$ A integriert und somit unter die Kontrolle des Methanol-induzierbaren Promotors gestellt.

### **Plasmid zur transienten Transformation von *N. benthamiana***

#### pBIN19AN (A. Djamei, pers. Mitteilung)

In diesem Plasmid sind Ti-Sequenzen vorhanden, die einen Transfer von *A. tumefaciens* in Wirtspflanzen, wie beispielsweise *N. benthamiana* ermöglichen (Bevan, 1984). Am 3'-Ende befindet sich eine „in frame“ Fusion mit dem *yfp* Gen.

#### pBIN19AN-Strep-um11464 (diese Arbeit)

Dieses Plasmid entstand, indem der *um11464* ORF ohne Signalpeptid über die Restriktionsschnittstellen *ApaI* und *NotI* in das Plasmid pBIN19AN integriert wurde. Am 3'-Ende wurde durch den Primer NG164 ein Stopp-Codon eingefügt, wodurch die C-terminale Fusion mit dem *yfp* Gen unterbrochen wurde. Am 5'-Ende wurde der ORF durch Amplifikation mit dem Primer oNS162 mit einem Strep-Tag fusioniert, welches der Proteinaufreinigung diene. Das Plasmid enthält eine Kan-Resistenz für die Selektion in *E. coli* und *A. tumefaciens*.

### **Plasmide für *S. cerevisiae***

#### pYST-O (A. Hof, pers. Mitteilung)

Dieses Plasmid diene als Vektor für die Hefesignalsequenzfalle. Es enthält das für das Enzym Invertase codierende Gen *suc2*, jedoch ohne ein Signalpeptid. Durch 5'-Fusion eines DNA-Abschnittes, welcher zur Sekretion befähigt, kann die Aktivität des Suc2 Proteins wieder hergestellt werden.

**pYST-O-um11464 (diese Arbeit)**

Eine Volllängenversion bzw. eine verkürzte Version des *um11464* ORFs wurden mittels der Primer NG101 und NG102 bzw. NG105 amplifiziert, mit *EcoRI* und *NotI* geschnitten

und in den Vektor pYST-O integriert. Dadurch kam es zur 3'-Fusion des Gens mit dem inaktiven *suc2* Gen.

## 4.4 Mikrobiologische und zellbiologische Methoden

### 4.4.1 Transformationen

#### 4.4.1.1 Rhobidium-Chlorid-vermittelte Transformation von *E. coli*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Cohen *et al.*, 1997. Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml dYT-Medium mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM MgSO<sub>4</sub> versetzt. Dieses Medium wurde mit 1 ml einer frischen TOP10- bzw. DH5α-Übernachtskultur angeimpft und die Kultur bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (3.000 Upm, 15 min, 4°C; Heraeus Biofuge Stratos) und in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30 bis 60-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (3.000 Upm, 15 min, 4°C; Heraeus Biofuge Stratos), in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

RF1-Lösung	100 mM RbCl
	50 mM MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O
	30 mM Kaliumacetat
	10 mM CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O
	15% (v/v) Glycerol
	in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> ; pH 5,8 (mit 0,2M Essigsäure)
	sterilfiltriert

RF2-Lösung	10 mM MOPS
	10 mM RbCl
	75 mM CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O
	15% (v/v) Glycerol

in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>; pH 6,8 (mit NaOH)  
sterilfiltriert

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl mit bis zu 10 µl Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) bzw. Ligationsansatz versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 1 min bei 42°C wurde der Transformationsansatz mit 150 µl dYT-Medium versetzt und 30-60 min bei 800 Upm und 37°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. Der Transformations-Ansatz wurde auf selektiven dYT-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 4.4.1.2 Transformation durch Elektroporation

Die Transformation durch Elektroporation wurde für *E. coli* sowie für *A. tumefaciens* verwendet. Eine frische Übernachtskultur wurde dazu 1:100 in 500 ml dYT-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz verdünnt und bei entsprechender Temperatur und 200 Upm bis zu einer OD<sub>600</sub> ≈ 0,7 inkubiert. Die Zellen wurden dann für 15 -30 min auf 0°C heruntergekühlt und anschließend abzentrifugiert (4000 g, 15 min, 4°C; Heraeus Biofuge Stratos). Das Pellet wurde 1x in 500 ml 10% Glycerin gewaschen. Nach Zentrifugation bei 4000 g, 15 min, 4°C wurden die Zellen in 10 ml kaltem 10% Glycerin resuspendiert, abzentrifugiert und schließlich in 1 bis 1,5 ml kaltem 10% Glycerin aufgenommen. Die transformationskompetenten Zellen wurden zu je 50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Zur Transformation wurden die elektrokompenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut. 50 µl Zellsuspension wurden mit bis zu 5 µl DNA gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde daraufhin in eine vorgekühlte 0,2 cm breite Elektroporationsküvette (peqlab, Erlangen) überführt und die Küvette in die vorgesehene Halterung des Gene Pulsers gestellt (Gene Pulser, BioRad). Direkt danach wurde der Puls ausgelöst (25 mF; 200 W; 2,0 kV). Die Entladungszeit sollte zwischen 4 und 5 msec liegen. Im Anschluss an die Entladung wurde sofort 300 µl dYT-Medium in den Transformationsansatz pipettiert. Die Zellen wurden zur Regeneration 30 - 60 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf selektiven Platten ausgestrichen.

#### 4.4.1.3 Blau-Weiß-Selektion von *E. coli* Transformanden

Die korrekte Insertion eines Konstrukts in Plasmide, die sich für die Blau-Weiß-Selektion eignen (beispielsweise pCR-TOPO2.1 und II), resultiert in einer Unterbrechung des lacZ-Gens, so dass keine funktionelle  $\beta$ -Galactosidase exprimiert wird, die X-Gal in einen blauen Indigofarbstoff spaltet. Kolonien, in denen Plasmide mit Insert enthalten sind, bleiben somit auf X-Gal-haltigen Platten weiß und können leicht von den blauen Kolonien mit Vektoren ohne Insertion des gewünschten Konstrukts unterschieden werden.

#### 4.4.1.4 Transformation von *U. maydis*

*U. maydis* wurde nach einem nach Schulz et al, 1990 und Gillissen et al., 1992 modifizierten Protokoll transformiert. Eine 50 ml Kultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> in YEPS<sub>L</sub> kultiviert und die Zellen anschließend geerntet (3.500 Upm, 5 min; Heraeus Biofuge Stratos). Die Zellen wurden einmal mit 25 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit 2,5 mg/ml Novozym 234 (Novo Nordisc, Kopenhagen, Dänemark) resuspendiert. Die so gestartete Protoplastierung, bei der die zigarrenförmigen Zellen durch Lyse der Zellwand eine kugelige Form annehmen, wurde mikroskopisch verfolgt. Nachdem etwa 50 - 70% der Zellen protoplastiert waren (5 - 15 min), wurden 10 ml eiskaltes SCS zugegeben und die Protoplasten durch 10-minütige Zentrifugation (2.400 Upm, 4°C; Heraeus Biofuge Stratos) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang dreimal wiederholt. Danach wurden die Zellen einmal mit 10 ml eiskaltem STC gewaschen und das Pellet schließlich in 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so gewonnenen Protoplasten wurden direkt transformiert oder zu 70  $\mu$ l aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

SCS-Lösung	20 mM Na-Citrat, pH 5,8 1 M Sorbitol in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> ; sterilfiltriert
------------	--

STC-Lösung	10 mM Tris-Cl, pH 7,5 100 mM CaCl <sub>2</sub> 1 M Sorbitol in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> ; sterilfiltriert
------------	--

Zur integrativen Transformation wurden 70 µl Protoplasten mit max. 10 µl linearisierter DNA (bis zu 5 µg) und 1 µl Heparin-Lösung (10 mg/ml) für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation für 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit 15 ml Top-Agar überschichteten Regenerationsagarplatte ausgestrichen, die das entsprechende zweifach konzentrierte Antibiotikum in 15 ml Bottom-Agar enthielt. Nach vier bis sieben Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit Zahnstochern auf Antibiotikum-haltigen PD-Platten vereinzelt. Potentielle Transformanten wurden mittels Southern-Analyse verifiziert.

STC/PEG-Lösung	40% PEG4000 in STC; sterilfiltriert
Regenerations-Agar (Schulz et al., 1990)	Top: 1,5 % (w/v) Bacto-Agar 1 M Sorbitol in YEPS <sub>L</sub> Bottom: wie Top, zusätzlich doppelt konzentriertes Antibiotikum

#### 4.4.1.5 Transformation von *S. cerevisiae*

*S. cerevisiae* wurde in YEPD zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 - 0,8 kultiviert. Die Zellen einer 50 ml Kultur wurden pelletiert (3.500 Upm, 5 min; Heraeus Biofuge Stratos) und in 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> resuspendiert. Zur integrativen Transformation wurden 300 µl einer Lithium-Acetat/PEG-Lösung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und 125 µl einer hitzedenaturierten Einzelstrang-Carrier-DNA (MoBiTec, Göttingen), 10 µl Plasmidlösung (1,5 µg Plasmid-DNA) sowie 100 µl der in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> resuspendierten Hefezellen zugegeben und für 1 min gevortext. Der Transformationsansatz wurde für 45 min bei 400 Upm und 42°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert und anschließend pelletiert (700g, 5 min; Heraeus Biofuge Pico). Das Zellpellet wurde in 100 µl 0,9%igem NaCl resuspendiert und komplett auf entsprechendem SD-Selektionsmedium ausplattiert. Nach etwa 3 Tagen konnten erste Kolonien geerntet werden.

Lithium-Acetat/PEG-Lösung

50% PEG4000

180 mM Lithium-Acetat

#### 4.4.1.6 Transformation von *P. pastoris*

Chemisch kompetente Zellen des *P. pastoris* Wildtyp-Stamms GS115 [Mut<sup>+</sup>, His<sup>-</sup>] wurden nach den Angaben des „*Pichia* EasyComp™ Transformation Kit“ Handbuch (Invitrogen, Karlsruhe) mit Plasmid-DNA transformiert.

#### 4.4.2 Filament- und Appressorieninduktion *in vitro*

Die *in vitro* Induktion von b-Filamenten und Appressorien wurde nach Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009 mit leichten Abwandlungen durchgeführt. Die jeweiligen Stämme wurden in YEPS<sub>L</sub> zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 kultiviert, pelletiert (3,000 Upm, 5min; Heraeus Biofuge Pico) und in 2% YEPS<sub>L</sub> (in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>) auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 eingestellt. Die Zellsuspension wurde mit 100 µM 16-Hydroxy-Palmitinsäure (HPS; 16-hydroxy hexadecanoic acid; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) versetzt und anschließend auf einen mit Parafilm M (Pechiney Plastic Packaging, Chicago/USA) ausgekleideten Objektträger gesprüht (EcoSpray; Roth, Karlsruhe). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Tropfen nicht größer als 1 mm waren. Die so inokulierten Oberflächen wurden in rechteckige Petrischalen auf feuchtes Filterpapier platziert und die Petrischalen mit Parafilm M versiegelt. Die Proben wurden für 16 - 18 h bei 28°C inkubiert. Für die Quantifizierung von Filamenten wurde die Anzahl der filamentös wachsenden Zellen relativ zur Gesamtzellzahl mikroskopisch bestimmt. Zur quantitativen Bestimmung von Appressorien wurden die Oberflächen vorerst mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> gespült, um nicht adhärierende Zellen zu entfernen. Die Oberflächen wurden anschließend mikroskopisch ausgewertet, indem die Anzahl der Filamente, die eine terminale Verdickung sowie eine Expression des Appressorien-spezifischen GFP-Reporters aufwiesen, relativ zur Gesamtzahl der Filamente gesetzt wurde.

Um Filamentbildung in Flüssigkultur zu induzieren, wurden die Zellen wie oben beschrieben kultiviert und vorbereitet. Die Zellsuspensionen wurden in 2 ml Reaktionsgefäßen auf einem Roll-Inkubator (Kisker-Biotec, Steinfurt) bei 20 Upm in nahezu waagerechter Position gedreht. Nach 18 h Inkubation bei 28°C wurde die Filamentbildung mikroskopisch analysiert und wie oben beschrieben quantifiziert. Alle quantitativen Analysen wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten durchgeführt.

#### 4.4.3 Bestimmung der Oberflächenhydrophobizität

Um die Hydrophobizität einer Oberfläche, zum Beispiel die einer Pilzkolonie, bestimmen zu können, wurden 10 µl einer 0,25% Evans-Blue-Lösung aufgebracht und die Tropfen getrocknet. Anschließend wurden die Durchmesser der eingetrockneten Tropfen gemessen und der Kontaktwinkeln unter Verwendung entsprechender mathematischer Formeln berechnet (Doehleemann *et al.*, 2006).

#### 4.4.4 Pathogenitätstest von *U. maydis*

Die zu testenden Stämme wurden in YEPS<sub>L</sub> zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 - 1,0 kultiviert, geerntet (3.500 Upm, 5min; Heraeus Biofuge Stratos) und in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf eine OD<sub>600</sub> von 1,0 eingestellt. Ca. 500 µl der Zellsuspension wurde über Spritzinfektionen in das Innere des Blattwirtels von sieben Tage alten Maispflanzen der Sorte Early Golden Bantam (Olds Seeds, Madison/USA) injiziert. Die Injektionsstelle wurde etwa 1 cm über der Erde gewählt, also etwa 2,5 bis 3 cm oberhalb des basalen Pflanzenmeristems. Dabei werden in der Regel die Blattscheiden des ersten und zweiten Blattes sowie die Blattspreiten des dritten und vierten Blattes durchstoßen.

Zur Quantifizierung der Pathogenitätssymptome wurden die Pflanzen sieben bzw. zwölf Tage nach Infektion analysiert und die Symptome je nach Stärke in 7 Kategorien eingeteilt (Tab. 6). In der Regel wurden je Stamm drei unabhängige Infektionen von 30 - 40 Pflanzen durchgeführt, um die Werte anschließend mitteln und prozentual zur Gesamtzahl der infizierten Pflanzen darstellen zu können.

**Tab. 6: Klassifizierung der Symptome nach Infektion mit *U. maydis***

Pflanzensymptom	Beschreibung
Keine Symptome	Keine Symptome nach <i>U. maydis</i> Infektion sichtbar
Chlorose	Gelblich-bleiche Färbung des Blattes
Ligula-Schwellung	Übergang von Blattscheide zur Blattspreite geschwollen
Einzeltumore	Einzelner Tumor am Blatt
Kleine Tumore	Tumore am Blatt kleiner als 2 mm
Große Tumore	Tumore an Blatt und Stamm größer als 2 mm
Starke Tumorbildung / Krümmung	Starke Tumorbildung an Blatt und Stamm bzw. Stammbasis; geht mit Biegung der Wachstumsachse einher
Tote Pflanzen	Pflanzen sterben aufgrund der <i>U. maydis</i> Infektion ab

## 4.5 Molekularbiologische Methoden

### 4.5.1 Isolierung von Nukleinsäuren

#### 4.5.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA, die später für Sequenzierungen verwendet werden sollte, wurde mit Hilfe des QIAprep Mini Plasmid Kits nach Herstellerangaben isoliert. Für andere Anwendungen, wie beispielsweise Restriktionsanalysen, wurde Plasmid-DNA nach dem Prinzip der kochenden Lyse (Sambrook *et al.*, 1989) extrahiert. Dazu wurden 1,5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur pelletiert (13.000 Upm, Heraeus Biofuge Pico). Dem Zellpellet wurden 350 µl STET-Puffer und 25 µl Lysozym-Lösung zugeführt, die Proben auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA, Staufen) für 1 min geschüttelt und anschließend 1 min bei 95°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 10 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert (Heraeus Biofuge Pico) und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 35 µl 3M Na-Acetat und 420 µl Isopropanol für 5 min gefällt und abzentrifugiert (13.000 Upm, 5 min; Heraeus Biofuge Pico). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, 5 min an der Luft getrocknet und in 100 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen. Mit dieser Methode gelang es routinemäßig, aus 1,5 ml Übernachtskultur etwa 50 µg Plasmid-DNA zu isolieren.

STET-Puffer	50 mM Na <sub>2</sub> -EDTA
	8% (w/v) Saccharose
	5% (v/v) Triton X-100
	in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
Lysozym-Lösung	10 mg/ml Lysozym (Interspex Products Inc., USA)
	in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
TE-Puffer	1 mM Na <sub>2</sub> -EDTA
	in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0



#### 4.5.1.2 Isolierung von genomischer DNA aus *U. maydis*

Diese Methode wurde nach Hoffman und Winston (1987) modifiziert. 2 x 2 ml einer Übernachtskultur in YEPS<sub>L</sub> wurden zusammen mit 0,3 g Glasperlen in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert (13.000 Upm, 3 min; Heraeus Biofuge Pico), der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl *Ustilago*-Lysispuffer und 500 µl TE-Phenol/Chloroform aufgenommen. Die Proben wurden für 15 - 20 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA, Staufen) geschüttelt und anschließend 15 min zentrifugiert (13.000 Upm; Heraeus Biofuge Pico). Nach der Phasentrennung wurden 400 µl des Überstands in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml 100% Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (13.000 Upm, 10 min; Heraeus Biofuge Pico) wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, für 5 min an der Luft getrocknet und in 30 µl TE mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen. Die Resuspendierung erfolge bei 55°C für etwa 15 min auf einem Eppendorf-Wärmeblock.

Ustilago-Lysispuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 50 mM Na <sub>2</sub> -EDTA 1% (w/v) SDS in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
TE-Phenol/Chloroform	Mischung aus gleichen Teilen Phenol (mit TE-Puffer äquilibriert) und Chloroform

#### 4.5.1.3 Isolierung genomischer DNA aus infizierten Maispflanzen

Sieben Tage alte Maispflanzen wurden wie in Kapitel 4.4.4 beschrieben mit *U. maydis* infiziert. Zu gewünschten Zeitpunkten nach Infektion wurde das dritte Blatt präpariert, wobei ein ca. 2 cm langer Blattbereich ca. 1 cm unterhalb der Einstichlöcher verwendet wurde. Mindestens 10 solcher Blattabschnitte wurden als Ausgangsmaterial für die DNA-Isolierung vereint. Die Blätter wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit einem Mörser zerkleinert. Das Material wurde anschließend in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl *Ustilago*-Lysispuffer sowie 500 µl TE-Phenol/Chloroform versetzt. Alle weiteren Schritte erfolgten wie in Kapitel 4.5.1.2 beschrieben.

#### 4.5.1.4 Isolierung von RNA aus *U. maydis* und infizierten Maispflanzen

Zur Isolation von RNA aus *U. maydis* wurden 2 x 2 ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert (13.000 Upm, 5 min, 4°C; Heraeus Biofuge Pico) und das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren. In noch gefrorenem Zustand wurden 0,3 g Glasperlen sowie 1 ml Trizol-Reagent (Invitrogen, Karlsruhe) zugegeben und das Pellet für 15 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA, Staufen) geschüttelt. Zur Phasentrennung wurden anschließend 200 µl Chloroform zugegeben, der Ansatz kräftig gevortext und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation (13.000 Upm, 15 min, 4°C; Heraeus Biofuge Pico) wurde die obere, wässrige Phase entnommen und in ein frisches Eppendorf-Gefäß, welches vorher mit 500 µl Isopropanol versehen wurde, überführt. Die Präzipitation der RNA erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur. Nach Zentrifugation bei 13.000 Upm, 15 min, 4°C wurde der Überstand verworfen und das Präzipitat mit 75% Ethanol gewaschen. Nach abermaliger Zentrifugation wurde der Ethanol-Überstand verworfen, das Pellet für 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 50 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

Zur RNA-Isolierung aus Blättern infizierter Maispflanzen wurden diese wie in Kapitel 4.5.1.3 präpariert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren, gemörst und analog der Isolierung von RNA aus *U. maydis* behandelt.

### 4.5.2 *In vitro* Modifikation von Nukleinsäuren

#### 4.5.2.1 Restriktion von DNA

Restriktionen von DNA wurden mittels Typ II-Restriktionsendonukleasen (NEB, Frankfurt) für 2 - 16 h bei Enzym-spezifischer Temperatur durchgeführt. Die verdaute DNA wurde später auf Agarosegelen analysiert. Ein typischer Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

0,5 – 2 µg reine DNA

2 µl enzymespezifischer 10 x NEB-Puffer

ggf. 2 µl 10 x BSA (NEB)

0,5 U Restriktionsendonuklease

ad 20 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

#### 4.5.2.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde T4 DNA Ligase (Roche, Mannheim) verwendet. In Ligationen, bei denen ein linearisierter Vektor mit einem Insert verbunden werden sollte, wurde die entsprechende DNA im molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. In Ligationen, bei denen drei Fragmente zu einem linearen DNA-Molekül ligiert werden sollten, wurde ein molares Verhältnis von 1:1:1 eingesetzt. Die Ligationen wurden für mindestens eine Stunde (RT) oder über Nacht (16°C) durchgeführt.

#### 4.5.2.3 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Je nach Anwendung wurden verschiedene Polymerasen eingesetzt, welche im Folgenden mit den entsprechenden typischen Ansätzen näher beschrieben werden.

Außerdem wird das PCR Programm nach folgendem Schema dargestellt: Initiale Denaturierung - [Denaturierung - Anlagerung - Elongation] x Zahl der Zyklen – finale Elongation. Die Elongationszeiten wurden je nach Größe des zu amplifizierenden Fragments und nach Synthesegeschwindigkeit der verwendeten Polymerase variiert. Die Anlagerungstemperatur der jeweils verwendeten Oligonukleotide wurde *in silico* mittels des Programms CloneManager 9 (Sci-Ed Software) bestimmt. Die PCR-Reaktionen wurden in dem Thermocycler PeqSTAR (peqlab, Erlangen) durchgeführt.

#### Phusion-Polymerase (Standardpolymerase bis ca. 6 kb; auch verwendet für inverse PCR; Finnzymes/NEB, Frankfurt)

Ansatz	etwa 50 µg Matrizen-DNA
	250 µM dNTPs (1:1:1:1 Verhältnis)
	1 µM Oligonukleotid 1
	1 µM Oligonukleotid 2
	1 x konzentrierter GC-Puffer (Finnzymes)
	0,5 U Phusion-Polymerase
Programm:	95°C/1 min - [95°C/30 s - 55-65°C/30 s - 72°C/30 s/kb] x 35 - 72°C/10 min

KOD Extreme Polymerase (inverse PCR; Novozym/Merck, Darmstadt)

Ansatz	etwa 50 µg Matrizen-DNA 250 µM dNTPs (1:1:1:1 Verhältnis) 1 µM Oligonukleotid 1 1 µM Oligonukleotid 2 1 x konzentrierter KOD-Puffer (Novagen) 1 U KOD-Extreme Polymerase
Programm:	94°C/2 min - [94°C/30 s - 55-65°C/15 s - 68°C/1 min/kb] x 35-40 - 68°C/10 min

Taq-Polymerase (Test-PCR; Fermentas, St. Leon-Roth)

Ansatz	etwa 50 µg Matrizen-DNA 250 µM dNTPs (1:1:1:1 Verhältnis) 1 µM Oligonukleotid 1 1 µM Oligonukleotid 2 1 x konzentrierter KCl-Puffer (Fermentas) 1 U Taq-DNA-Polymerase
Programm:	94°C/5 min - [94°C/1 min - 55-65°C/1 min - 72°C/1 min/kb] x 35 - 72°C/10 min

**4.5.2.4 Ortspezifische Mutagenese von Nukleinsäuren mittels PCR**

Nukleinsäuremutagenesen zum gezielten Austausch von einzelnen Basen in Plasmiden wurden mittels PCR unter Verwendung von Primern, die die gewünschten Mutationen enthielten, durchgeführt. Hierbei wurde das „QuikChange (Multi) Kit“ (Stratagene, USA) nach Herstellerangaben angewendet.

**4.5.2.5 Quantitative Real-Time PCR**

Für quantitative Real-Time PCR (Q-PCR) wurde RNA wie in Kapitel 4.5.1.4 beschrieben extrahiert. DNA-Reste in den RNA-Proben wurden mittels des „Turbo DNA-free“ Kits (Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt) entfernt und die RNA daraufhin in cDNA revers transkribiert („Superskript III First Strand Synthesis SuperMix“; Invitrogen, Karlsruhe). Die cDNA wurde für Q-PCR Reaktionen eingesetzt, die mit Hilfe des „Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG“ Kits von Invitrogen nach Herstellerangaben durchgeführt

wurde. Für die PCR Reaktionen wurden in der Regel 1 - 5 µl cDNA eingesetzt. Als Referenzfarbstoff für einen 50 µl PCR-Ansatz diente 1µl einer 1 µM Fluorescein-Lösung (Bio-Rad, München).

Die Reaktionen wurden in einem Bio-Rad iCycler-System unter der Verwendung des Programmes 95°C/2 min – [95°C/30 s – 62°C/30 s – 72°C/30 s] x 45 durchgeführt. Die Spezifität der Reaktionen wurde nach Beenden der PCR anhand der vom Gerät berechneten Schmelzkurve überprüft. Der CT („threshold cycle“- Wert, der den Punkt beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt, wurde mittels der Bio-Rad Software Version 3.0 ermittelt. Die relativen Expressionwerte wurden mit Hilfe des Programmes *Gene Expression Macro* (Bio-Rad) berechnet. Zur Bestimmung der *um11464*-Expression wurde das konstitutiv exprimierte Kontrollgen *ppi* (Peptidylprolyl isomerase) verwendet. Zur quantitativen Bestimmung der pilzlichen Biomasse in infizierten Maispflanzen wurde das Verhältnis von Pilz-DNA (*mfa1*) zu Pflanzen-DNA (*GAPDH*, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) gebildet. Dies geschah in drei unabhängigen Experimenten, wonach die Werte gemittelt werden konnten.

### 4.5.3 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

#### 4.5.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese wurden Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld größenspezifisch aufgetrennt. Hierbei wandert die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung Anode. Die Agarosekonzentration der verwendeten Gele variierte zwischen 0,8% und 2,0%. Zur Herstellung der Gele wurde die jeweilige Menge an Agarose in 1 x TAE oder 0,5 x TBE durch Aufkochen gelöst und mit Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe) versetzt (Endkonzentration 0,25 µg/ml). Das Gel wurde in flüssigem Zustand in eine Gelform gegossen, nach dem Erstarren in eine dafür vorgesehene Gelkammer transferiert und mit dem entsprechenden Puffer bedeckt. Die DNA wurde in Gelauftragspuffer aufgenommen, auf der Seite der Kathode auf das Gel geladen und bei 80 - 150 mA aufgetrennt. Als Größenstandard wurde ein 1 kb ladder (0,5 - 10 kb; NEB, Frankfurt) oder 100 bp ladder (0,1 - 1,5 kb; NEB, Frankfurt) verwendet. Die DNA wurde durch UV-Bestrahlung bei 254 nm sichtbar gemacht. Die Dokumentation fand mittels einer Geldokumentationsanlage (UVsolo TS Imaging System; Biometra, Göttingen) statt.

5 x TBE-Puffer	440 mM Tris-Base 440 mM Borat 10 mM Na <sub>2</sub> -EDTA in H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub> .
50 x TAE-Puffer	2 M Tris-Base 2 M Acetat 50 mM Na <sub>2</sub> -EDTA in H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub> .
6 x Gelauftragspuffer (nicht-denaturierend)	50% (w/v) Saccharose 0,01% (w/v) Bromphenolblau in TE-Puffer

#### 4.5.3.2 Southern-Blot Analyse

Genomische DNA aus *U. maydis* Transformanten, welche nach der in Kapitel 4.5.1.2 beschriebenen Methode isoliert wurde, wurde zunächst mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die Enzyme wurden dabei so gewählt, dass aufgrund des eingebrachten Konstrukts die Anzahl und Größe der entstandenen Fragmente in diesem Lokus verändert war. Die restringierte DNA wurde anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (TAE-Gel, 1% Agarose, 80 mA) und mit einer nach (Southern, 1975) modifizierten Methode auf eine Nylonmembran transferiert. Vor dem Transfer wurde das Gel für 20-30 min in 0,25 M HCl zur Depurinierung langsam schwenkend inkubiert. Dies ermöglichte auch den Transfer großer DNA-Fragmente. Anschließend wurde das Gel für 20-30 min in 0,4 M NaOH äquilibriert. Der Transfer auf eine Nylonmembran (Hybond-N+; GE Healthcare, München) erfolgte über Kapillarkräfte, indem die Transfer-Lösung (0,4 M NaOH) aus einem Pufferreservoir durch das Gel hindurch in einen Stapel Papierhandtücher gesaugt wurde. Die DNA-Fragmente werden dabei durch den Flüssigkeitsstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüber liegende Nylonmembran. Der Transfer erfolgte in der Regel über Nacht, mindestens jedoch für 5 h.

Zur Detektion der immobilisierten DNA wurden DNA-Sonden mittels PCR unter Verwendung des PCR DIG Labelling Mix (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben hergestellt. Die markierte Sonde wurde in 30 ml Hybridisierungspuffer aufgenommen und 10 min bei 98°C denaturiert. Die Membranen wurden in einem Hybridisierungssofen

mindestens 30 min mit Southern-Hybridisierungspuffer prähybridisiert (65°C) und der Prähybridisierungspuffer anschließend durch die denaturierte Sonde ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte drehend bei 65°C über Nacht. Danach wurden die Membranen zweimal mit Southern Waschpuffer bei 65°C gewaschen. Die weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Nach einem Waschschrift mit DIG-Waschpuffer für 5 min wurden die Membranen für mindestens 30 min in DIG2-Puffer inkubiert. Dann wurden die Membranen für mindestens 30 min mit Antikörperlösung geschwenkt. Der Antikörper ist dabei kovalent an eine alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt. Um überschüssigen Antikörper von den Membranen zu entfernen, wurden diese im Anschluss zweimal für je 15 min mit DIG-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Membranen für 5 min mit DIG3-Puffer äquilibriert, um den für die alkalische Phosphatase optimalen pH-Wert von 9,5 zu erreichen. Deren Substrat CDP Star (Roche, Mannheim) wurde 1:100 in DIG3 verdünnt und für 5 min zu den Membranen gegeben. Die Membranen wurden in Plastikfolie eingeschweißt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Membranen in eine Kassette mit Verstärkerfolie gelegt. Die Exposition des Filmes (CEA RP New, AGFA HealthCare) erfolgte je nach Intensität des Signals für 1 bis 30 min durch Auflegung des Filmes auf die eingeschlagene Membran. Entwickelt wurden die Filme in einer Röntgenfilm-Entwicklermaschine (QX-60, Konica).

Southern-Hybridisierungspuffer	0,5 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 7% (w/v) SDS
Southern-Waschpuffer	0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 1% (w/v) SDS
1 M Natriumphosphatpuffer	Lösung 1: 1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Lösung 2: 1M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O Durch Mischung von Lösung 1 und 2 pH 7,0 einstellen
DIG1	0,1 M Maleinsäure, pH 7,5 0,15 M NaCl
DIG2	1% (w/v) Milchpulver in DIG1

DIG3	0,1 M Maleinsäure, pH 9,5 0,1 M NaCl 0,05 M MgCl <sub>2</sub>
DIG-Wasch	0,3% (v/v) Tween-20 in DIG1
CDP-Star-Lösung	100 µl-CDP-Star (Roche) in 10 ml DIG

## 4.6 Biochemische Methoden

### 4.6.1 Gewinnung von Proteinextrakten

#### 4.6.1.1 Gewinnung von Proteinextrakten aus *U. maydis*

*U. maydis* Sporidien wurden in YEPS<sub>L</sub> bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 angezogen und 10 ml dieser Kultur pelletiert (3.500 Upm, 5 min; Heraeus Biofuge Stratos). Das Zellpellet wurde in 5x SDS-Gelladepuffer (vgl. Kapitel 4.6.4.1) resuspendiert und für 10 min bei 95°C erhitzt (Eppendorf-Wärmeblock, 800 Upm). Nach Zugabe von 0,3 g Glasperlen wurden die Proben für 15 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA, Staufen) geschüttelt. Nach erneutem Erhitzen (5 min, 95°C, 800 Upm) wurden die Proben abzentrifugiert (13.000 Upm, 1 min; Heraeus Biofuge Pico) und 15 µl des Überstandes für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt.

#### 4.6.1.2 Proteinisolation aus *U. maydis* Kulturüberständen

Für die Analyse von *U. maydis* Kulturüberständen wurden entsprechende *U. maydis* Stämme in 50 ml YEPS<sub>L</sub> bzw. CM-Flüssigmedium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 geschüttelt und die Zellen durch Zentrifugation bei 3.500 Upm (SG200 und Derivate) bzw. 8.000 Upm (AB33 und Derivate) vom Kulturüberstand separiert. Nicht vollständig pelletierte Filamente aus Kulturüberständen induzierter AB33 Zellen wurden zusätzlich durch Filtration (Falten-Filter, Macherey-Nagel/MAGV, Rabenau-Londorf) beseitigt. In den Überstand sekretierte *U. maydis* Proteine wurde anschließend durch TCA-Präzipitation (vgl. Kapitel 4.6.3) stark ankonzentriert.



#### 4.6.1.3 Subzelluläre Fraktionierung

*U. maydis* wurde in YEPS<sub>L</sub> bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 angezogen und 50 - 100 ml dieser Kultur pelletiert (3.500 Upm, 5 min; Heraeus Biofuge Stratos). Das Zellpellet wurde in 10 ml Extraktionspuffer gewaschen und in 1 ml des gleichen Puffers wieder aufgenommen. Nach Zugabe von 0,3 g Glasperlen wurden die Proben für 10 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA, Staufen) geschüttelt und die Zelltrümmer (P1) anschließend abzentrifugiert (3.000 Upm, 5 min, 4°C; Heraeus Biofuge Stratos). Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und abermals zentrifugiert (15.000 Upm, 30 min, 4°C), wobei Kompartimente wie Mitochondrien und Vacuolen (P2) sedimentierten. Durch weitere Zentrifugation des Überstandes (22.000 Upm, 60 min, 4°C) erhielt man die Plasmamembran-Fraktion (P3). Abschließend wurde der Überstand durch Ultrazentrifugation (100.000 Upm, 60 min, 4°C; Sorvall WX) von Bestandteilen wie Endoplasmatischem Retikulum, Golgi und vacuoläre Membranen separiert (P4) und letztlich nach Überführung in ein frisches Eppendorfgefäß durch TCA-Präzipitation (vgl. Kapitel 4.6.3) stark ankonzentriert (Cytoplasmafraktion, P5).

Extraktionspuffer	200 mM Tris-HCl, pH8,0
	2 mM MgCl <sub>2</sub>
	1 mM EDTA
	1 mM EGTA
	1 mM DTT
	0,3% (v/v) Protease Inhibitor Cocktail
	(kurz vor Verwendung; Roche, Mannheim)

#### 4.6.1.4 Gewinnung von Proteinextrakten aus *Z. mays* und *N. benthamiana*

Infizierte Pflanzenteile von *Z. mays* bzw. *N. benthamiana* wurde geerntet, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und sorgfältig gemörsert. Das gefrorene Pflanzenpulver wurde kurz auf Eis angetaut. Das angetaute Material wurde 1:2 mit Extraktionspuffer aufgefüllt und für ca. 15 min auf Eis inkubiert. Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation (8.500 Upm, 30 min, 4°C; Heraeus Biofuge Stratos) separiert und der Überstand durch einen Nylon-Filter (40 µm, BD Biosciences) von verbliebenem unlöslichem Material befreit. Für die SDS-PAGE wurden 10 - 15 µl des Überstandes eingesetzt.

Extraktionspuffer	100 mM Tris-HCl, pH 7,5
	100 mM NaCl
	5 mM EDTA
	5 mM EGTA
	10% (v/v) Glycerol
	0,1% (v/v) Triton X-100
	0,3% (v/v) Protease Inhibitor Cocktail (kurz vor Verwendung; Roche, Mannheim)
	ad H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>

#### **4.6.2 Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Quantifizierung löslicher Proteine in Proteinextrakten und Fraktionen gereinigten Proteins wurden mit Hilfe der Methode von Bradford, 1976 durchgeführt. Als Eichprotein wurde Rinderserumalbumin (BSA; Sigma-Adrich, Deisenhofen) verwendet.

#### **4.6.3 Proteinfällung**

Für die Trichloracetat-Fällung (TCA-Fällung) von Proteinen wurden Proteingemische mit DOC (Endkonzentration 0,02%) versetzt, gut gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 10% (v/v) TCA zugegeben und die Proteine über Nacht bei 4°C gefällt. Die präzipitierten Proteine wurden zentrifugiert (8.000 Upm, 30 min, 4°C; Heraeus Biofuge stratos) und das Pellet nach kurzer Lufttrocknung in SDS-Gelladepuffer (Kapitel 4.6.4.1) aufgenommen. Zur Neutralisierung des pH wurde tropfenweise eine 2M Tris-Lösung zugegeben.

#### **4.6.4 Auftrennung und Nachweis von Proteinen**

##### **4.6.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur Auftrennung von Proteinen wurde eine diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) angewandt. Bei dieser Methode werden Proteine für 5 min bei 95°C mit 5x SDS-Gelladepuffer gekocht, um sie vollständig zu denaturieren und ihnen durch Bindung an SDS-Moleküle eine konstant negative Ladung zu verliehen. Dies erlaubt die anschließende Auftrennung in

einem elektrischen Feld. Hierzu wurden Gelkammern (Mini Protean System; Bio-Rad, München) mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Die Gele setzten sich aus Sammelgel und Trenngel zusammen. Das Sammelgel dient der Konzentrierung der Proteine in einer Ebene vor dem Eintritt in das Trenngel. Im Trenngel werden die Proteine durch ein Polyacrylamidnetz nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Die Molekülmasse der aufgetragenen Proteine wurde durch ein gefärbtes Proteinstandardgemisch (15 - 170 kD; Prestained Page Ruler; Fermentas, St. Leon-Roth) abgeschätzt. Die Auftrennung erfolgte bei 50 mA/Gel.

5x SDS-Gelladepuffer	1,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 30% (w/v) SDS 0,15% (w/v) Bromphenolblau 10% Glycerin in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> 50 mM DTT (kurz vor Verwendung)
SDS-Laufpuffer	192 mM Glycerin 0,1% (w/v) SDS in 25 mM Tris-HCl, pH 8,3
Sammelgel	5% (v/v) Acrylamid 0,1% (w/v) SDS in 125 mM Tris-HCl, pH 6,8 zum Starten der Polymerisation: 0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat 0,05% (v/v) TEMED
Trenngel	8 - 10% (v/v) Acrylamid 0,1% (w/v) SDS in 375 mM Tris-HCl, pH 8,8 zum Starten der Polymerisation: 0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat 0,05% (v/v) TEMED

#### 4.6.4.2 Proteinnachweis in SDS-Polyacrylamidgelen mittels Commassie-Proteinfärbung

Zur Anfärbung von Proteinen in SDS-Gelen wurde die Commassie-Färbung (Nachweisgrenze: 200-400 ng Protein pro Bande) durchgeführt. Die Färbung der Gele erfolgte für 15 - 30 min in einer Commassie-Maldi-Färbelösung. Anschließend wurden die Gele in einer Entfärbelösung entfärbt, wobei sie hin und wieder mit frischer Entfärbelösung überschichtet wurden.

Commassie-Maldi-Färbelösung	50% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure 0,2% (w/v) Brilliant Blau R250 in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
-----------------------------	---

Entfärbelösung	50% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
----------------	---

#### 4.6.4.3 Immunologischer Proteinnachweis durch Chemilumineszenz (Western Blot)

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels Semi-dry Transfer System (Bio-Rad, München) auf eine PVDF-Membran (GE Healthcare, München) übertragen. Die Membran wurde vor Verwendung durch kurzes Benetzen mit Methanol aktiviert. Es wurde eine Lage 3 mm Whatman-Papier in Transfer-Puffer befeuchtet und mit der PVDF-Membran bedeckt. Auf die Membran wurde blasenfrei das SDS-Gel gelegt und mit einem weiteren feuchten 3 mm Whatman-Papier bedeckt. Der Transfer erfolgte für 1 - 2 h bei 80 mA/Gel.

Western-Transfer-Puffer	192 mM Glycin 15% (v/v) Methanol in 25 mM Tris-HCl, pH 10,4
-------------------------	---

Die auf die PVDF-Membranen überführten Proteine wurden immunologisch detektiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tab. 7 zusammengefasst. Dazu wurde die Membran mit Bockierlösung für 1 h bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert, kurz mit TBS-T gewaschen und dann für 1 - 12 h bei 4°C mit Antikörperlösung, welche den

primären Antikörper enthielt, geschwenkt. Daraufhin wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen und anschließend mit Antikörperlösung, welche den sekundären Antikörper enthielt, für 30 – 60 min bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert. Es wurden Meerrettich-Peroxidase- (HRP; „horse raddish peroxidase“) Konjugate als sekundäre Antikörper verwendet. Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS-T wurde die Chemolumineszenz-Reaktion durchgeführt, indem die Membran für fünf Minuten mit ECLReagenz (GE Healthcare, München) inkubiert wurde. Die Membranen wurden dann in eine Folie überführt und in eine Kassette mit Verstärkerfolie gelegt. Die Exposition des Filmes (Kodak XOMaz XAR-5) erfolgte je nach Intensität für 1 bis 30 min durch Auflegung des Filmes auf die eingeschlagene Membran. Entwickelt wurden die Filme in einer Röntgenfilm- Entwicklermaschine (QX-60; Konica, München).

TBS-T                      150 mM NaCl  
                                  0,1% (v/v) Tween20  
                                  in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5

Blockierlösung        5% (w/v) Milchpulver in TBS-T

Antikörperlösung     Antikörper verdünnt in 3% (w/v) Milchpulver in TBS-T

**Tab. 7: Verwendete Antikörper**

Antikörper	Wirt	Verwendung <sup>1</sup>	Bezug
anti-HA	Maus, Hase	Primärer Antikörper zur Detektion von HA-Fusionsproteinen in Western-Analysen und Kolonie-Sekretionstests (1:10000)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
anti-GFP	Maus	Primärer Antikörper zur Detektion von GFP-Fusionsproteinen in Western-Analysen (1:5000)	Roche (Mannheim)
anti-c-Myc	Maus	Primärer Antikörper zur Detektion von Myc-Fusionsproteinen in Western-Analysen (1:5000)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
anti-Flag	Maus	Primärer Antikörper zur Detektion von Flag-Fusionsproteinen in Western-Analysen (1:10000)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
anti-Tubulin	Maus	Primärer Antikörper zur Detektion von Tubulin in Western-Analysen (1:5000)	Calbiochem/Merck (Darmstadt)
Strep-Tactin HRP		HRP-gekoppelter Antikörper zur	IBA (Göttingen)

conjugate		Detektion von Strep-Fusionsproteinen (1:2500)	
anti-Maus-HRP	Pferd	HRP-gekoppelter, sekundärer Antikörper zur Detektion von primärem, aus Maus gewonnenem Antikörpern (1:10000)	Cell Signaling Technology (Denver/USA)
anti-Kaninchen-HRP	Ziege	HRP-gekoppelter, sekundärer Antikörper zur Detektion von primärem, aus Kaninchen gewonnenem Antikörpern (1:10000)	Cell Signaling Technology (Denver/USA)
anti-Maus-AF488	Ziege	Sekundärer, fluorophor-gekoppelter Antikörper zur Detektion von primärem, aus Maus gewonnenem Antikörper; Verwendung in <i>in situ</i> Immunolokalisierungen (1:1500)	Invitrogen (Karlsruhe)

<sup>1</sup>Die jeweils verwendete Verdünnung ist in Klammern angegeben

#### 4.6.4.4 Kolonie-Sekretionstest

Für diesen Test wurden Nitrocellulosemembranen (GE Healthcare, München) auf PD-Festmedium platziert. Es wurden *U. maydis* Kulturen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 inkubiert und in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 eingestellt. Von diesen Zellsuspensionen wurden 5 µl auf die Membranen getropft und die Platte für 16 h bei 28°C inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien unter fließendem Wasser mit Hilfe eines Zellschabers (Greiner Bio-one, Frickenhausen) vorsichtig entfernt. Die von der Kolonie auf die Membran sekretierten Proteine wurden wie in Kapitel 4.6.4.3 beschrieben detektiert.

### 4.6.5 Bestimmung post-translationaler Proteinmodifikationen

#### 4.6.5.1 Deglykosylierung von Proteinen

Zur Spaltung N-glykosidischer Proteinmodifikationen wurden die Proteine in 1x Glykoprotein-Denaturierungspuffer (NEB, Frankfurt) denaturiert und anschließend mit den Enzymen PNGaseF oder EndoHf (NEB, Frankfurt) nach Herstellerangaben behandelt. Für O-Deglykosylierungen wurden die Proteine mit Neuraminidase und Endo-α-N-Acetylgalactosaminidase (NEB, Frankfurt) nach Herstellerprotokoll behandelt.

#### 4.6.5.2 Identifikation eines Glykosylphosphatidylinositol (GPI) -Ankers

Zur Identifikation einer GPI-Verankerung des Proteins Um11464 in die pilzliche Plasmamembran bzw. Zellwand wurde wie in Gilbert *et al.*, 2012 beschrieben vorgegangen.

Eine in 50 ml YEPS<sub>L</sub> angezogene *U. maydis* Kultur wurde pelletiert (3.500 Upm, 5min; Heraeus Biofuge Stratos) und die Plasmamembran sowie Zellwand wie in Kapitel 4.6.1.3 beschrieben voneinander separiert. Um nicht-kovalent gebundene Proteine zu entfernen, wurden die jeweiligen Pelletfraktionen mit Extraktionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 2% SDS, 100 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 40 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) versehen und für 5 min bei 95°C gekocht. Anschließend wurde das Zellwandpellet zur Freisetzung Glucan-verankerter Proteine mit  $\beta$ -1,3-Glucanase (Sigma-Aldrich, Deisenhofen), das Plasmamembranpellet mit 1U PI-PLC (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) versehen und für 2 – 3 h bei 37°C inkubiert. Solubilisierte Proteine wurden anschließend nach der TCA-Methode gefällt (vgl. Kapitel 4.6.3) und 15  $\mu$ l für SDS-PAGE eingesetzt.

## 4.6.6 Heterologe Expression von Um11464

### 4.6.6.1 Heterologe Expression von Um11464 in *E. coli*

Um11464 wurde zur späteren Immunisierung von Kaninchen als N-terminales 6xHis-SUMO-Fusionsprotein mit C-terminalem *ha*-Tag rekombinant in *E. coli* BL21 (DE3)pLysS hergestellt. Die Klonierung des *um11464* Gens in den Vektor pET SUMO (Invitrogen, Karlsruhe) wurde nach Angaben des „Champion™ pET SUMO Protein Expression System“-Protokolls vorgenommen und das Plasmid anschließend in den entsprechenden BL21 (DE3)-Stamm transformiert. Dieser wurde aerob bei 37°C kultiviert und nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,8 mit 1 mM IPTG versehen, um die Proteinexpression unter Kontrolle des starken *T7lac* Promotors zu induzieren. Nach einer Induktionszeit von 18 – 20 h bei 20°C wurden die Zellen geerntet und das Pellet bei -20°C gelagert.

### 4.6.6.2 Nicht-denaturierende Lyse und Reinigung rekombinanten Proteins über Affinitätschromatographie

Zur Analyse der Produktion und Löslichkeit von SUMO-6xHis-Um11464HA wurden die Zellen (Gesamtzellextrakt) mittels BugBuster Master Mix (Novagen) nach Herstellerangaben lysiert. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (8.500 Upm, 30 min, 4°C; Heraeus Biofuge Stratos) und Aliquots der unlöslichen Zelltrümmerfraktion sowie des löslichen Proteinrohextraktes für SDS-PAGE vorbereitet.

Die lösliche Überstandsfraktion wurde anschließend mittels *His*-tag Affinitätschromatographie über eine Ni-NTA Matrix (Qiagen, Hilden) nach dem „HisTrap-

Batch Purification“-Protokoll (GE Healthcare) aufgereinigt. Die unterschiedlichen Fraktionen (unlösliche und lösliche Fraktion, Durchfluss-, Wasch- und Eluatfraktionen) wurden mit Hilfe von SDS-PAGE bzw. Westernblot analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass das Um11464-Fusionsprotein nur in geringem Maße in der löslichen Überstandsfraction detektiert wurde und somit nur wenig aufgereinigtes Protein gewonnen werden konnte.

#### 4.6.6.3 Denaturierende Reinigung von SUMO-6xHis-Um11464HA

Da das Protein größtenteils in der unlöslichen Zelltrümmerfraktion in Form von „inclusion bodies“ lokalisierte, wurde es im Folgenden unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt. Dazu wurde das Zellpellet (Gesamtzellextrakt) in denaturierendem Lysispuffer resuspendiert und für 60 min unter leichtem Rühren bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Trennung der Zelltrümmer (unlösliche Fraktion) vom Überstand (lösliche Fraktion) durch Zentrifugation bei 8.500 Upm für 30 min (Heraeus Biofuge Stratos) wurde der lösliche Proteinrohextrakt mittels denaturierender *His*-tag Affinitätschromatographie über eine Ni-NTA Matrix (Qiagen, Hilden) nach dem „HisTrap-Batch Purification“-Protokoll (GE Healthcare) aufgereinigt. Dabei wurde die Matrix für 1 h schwenkend mit dem Lysat inkubiert und anschließend 3x mit dem 5-fachem Säulenvolumen an Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde 3x mit 1 ml Elutionspuffer eluiert und die unterschiedlichen Fraktionen mit Hilfe von SDS-PAGE bzw. Westernblot analysiert.

Denaturierender Lysispuffer	20 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH7,4 500 mM NaCl 8 M Harnstoff
Waschpuffer	20 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH7,4 500 mM NaCl 20 mM Imidazol 8 M Harnstoff
Elutionspuffer	20 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH7,4 500 mM NaCl 500 mM Imidazol 8 M Harnstoff



#### 4.6.6.4 SUMO-Protease-Verdau

Nach erfolgter Aufreinigung des Um11464-Fusionsproteins wurde dieses einem SUMO-Protease-Verdau unterzogen, um die N-terminale 6xHis-SUMO-Fusion zu entfernen. Hierzu wurde nach Herstellerangaben gemäß des „Champion™ pET SUMO Protein Expression System“-Protokolls vorgegangen, wobei 20 – 40 µg des aufgereinigten Um11464-Fusionsproteins mit 10 µl SUMO-Protease (Invitrogen, Karlsruhe) für 3 – 5 h bei 30°C inkubiert wurde. Die Abspaltung des SUMO-6xHis-Fusionsproteins wurde mittels SDS-PAGE überprüft.

#### 4.6.6.5 Gewinnung von Um11464-spezifischem, polyklonalen Antikörper

Für die Generierung von Um11464-spezifischen Antikörpern wurde insgesamt 42 µg gereinigtes und SUMO-Protease-verdautes Protein (vgl. Kapitel 4.6.6.3 und 4.6.6.4) auf SDS-Gele aufgetragen und aufgetrennt. Nach Commassie-Blaufärbung wurden die entsprechenden Banden ausgeschnitten und zu Davids Biotechnologie GmbH (Regensburg) geschickt. Dort wurde ein Kaninchen mit 3x 5 - 10 µg Protein (Um11464-HA) immunisiert.

#### 4.6.6.6 Heterologe Expression von Um11464 in *P. pastoris*

Die heterologe Expression von Um11464 in *P. pastoris* erfolgte nach den Angaben im „EasySelect™ *Pichia* Expression Kit“ Handbuch (Invitrogen, Karlsruhe).

#### 4.6.6.7 Heterologe Expression von Um11464 über transiente *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation von *N. benthamiana*

Um11464 wurde für spätere biochemische Analysen als N-terminales *Strep*-Fusionsprotein in *N. benthamiana* hergestellt. Zur Infektion von *N. benthamiana* mit *A. tumefaciens* wurden Stämme, die die gewünschten Plasmide enthielten, in dYT-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz aerob angezogen und bei einer OD<sub>600</sub> von 0,2 mit 125 µM Acetosyringon (Sigma-Aldrich, Weinheim) versetzt. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,6 wurden die Zellen geerntet, 3x mit 10 ml Infiltrationsmedium (125 µM Acetosyringon, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MES/KOH, pH 5,4) gewaschen und anschließend in selbigem auf eine OD<sub>600</sub> von 1,0 gebracht. Jeweils 2 – 3 mittelgroße Blätter von ca. 6 Wochen alten Tabakpflanzen wurden auf der Blattunterseite mit Hilfe einer 1 ml Plastikspritze ohne Nadel mit der

Suspension infiltriert und die infiltrierten Blattstellen markiert. 4 – 5 Tage nach Infiltration wurden die markierten Blattbereiche wie in Kapitel 4.6.1.4 beschrieben geerntet und Proteine extrahiert. Das Lysat wurde anschließend mittels *Strep*-tag Affinitätschromatographie über eine Strep-Tactin Sepharose (IBA, Göttingen) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

#### **4.6.7 Polysaccharid-Bindungs-Versuche**

Die Affinität des in *N. benthamina* rekombinant gewonnenen Fusionsproteins *Strep*-Um11464 (vgl Kapitel 4.6.6.7) zu diversen Polysacchariden wurde wie in van den Burg *et al.* (2006) beschrieben, getestet. Allerdings wurden leichte Abwandlungen vorgenommen, in dem das Inkubationsmedium durch Wasser ersetzt und die Inkubationszeit auf 4 h bei 4°C verlängert wurde (A. Kombrink, Phytopathology, Universität Wageningen; mündliche Mitteilung).

### **4.7 Färbungen**

#### **4.7.1 Färbung mit Calcofluor white**

Um die Zellwand von *U. maydis* sichtbar zu machen wurde Calcofluor white (CW; Fluorescent Brightener 28; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) verwendet. Dafür wurden Zellsuspensionen mit Calcofluor-Färbelösung in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Zur Färbung von adhäsiven Filamenten wurden 5 µl Färbelösung auf die zu mikroskopierende Oberfläche gegeben. Um Hyphen und Appressorien von *U. maydis* auf der Pflanzenoberfläche sichtbar zu machen, wurden Blattproben 16 - 18 h nach Infektion geerntet. Dazu wurde das 3. Blatt präpariert, indem ein 2 cm langes Stück 1 cm unterhalb der Einstichlöcher ausgeschnitten wurde. Nach Entfernung der Mittellamelle wurde das Blattfragment für etwa 30 s in Calcofluor-Färbelösung gegeben und kurz mit Wasser gewaschen. Danach wurde das Präparat mit der Innenseite nach oben auf einen Objektträger gelegt und mikroskopiert.

Calcofluor-Stammlösung      10 mg/ml Fluorescent Brightener 28 in DMSO  
Lagerung: dunkel bei -20°C

Calcofluor-Färbelösung	1:100 Verdünnung der Stammlösung in 0,2 M Tris-HCl, pH 8,0 Lagerung: dunkel bei 4°C
------------------------	---

#### 4.7.2 Färbung mit WGA/Alexafluor-488 und Propidium-Iodid

Diese Färbemethode vereint die Visualisierung von Pilzhypen mittels WGA/Alexafluor-488 (WGA/AF-488) in infiziertem Pflanzengewebe, welches mit Propidium-Iodid (PI) gegengefärbt wird.

Für die Färbung wurden Blattproben wie in Kapitel 4.7.1 beschrieben präpariert und über Nacht (oder länger) in 100% Ethanol entfärbt. Danach wurden die Blätter für 3 h in 10% KOH bei 85°C inkubiert und die Proben anschließend mehrfach mit PBS gewaschen. Die Inkubation in der WGA-AF488/PI-Färbelösung erfolgt für 30 min; währenddessen wurden die Blätter 3 x 5 min bei 100 mbar vakuumfiltriert (CVC 3000; Vacuubrand, Wertheim). Nach erfolgter Färbung wurden die Proben in PBS entfärbt und dunkel bei 4°C bis zur Analyse durch konfokale Mikroskopie gelagert.

PI-Stammlösung	10 mg/ml Propidium Iodid in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> Lagerung: dunkel bei 4°C
WGA-AF488 Stammlösung	1 mg/ml WGA-Alexafluor-488 in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> Lagerung: dunkel bei 4°C
WGA-AF488/PI-Färbelösung	20 µg/ml Propidium Iodid 10 µg/ml WGA-Alexafluor 488 0,02% Tween20 in PBS, pH 7,4
PBS (phosphate-buffered saline)	8 mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,7 mM KCl 137 mM NaCl pH 7,4

### 4.7.3 Biotinylierung von Zelloberflächen

Die Biotinylierung von *U. maydis* Sporidien wurde wie in Böhmer *et al.*, 2008 beschrieben, vorgenommen. Hierzu wurden *U. maydis* Sporidien in YEPS<sub>L</sub> zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 – 0,8 kultiviert, abzentrifugiert (3.500 Upm, 5min; Heraeus Biofuge Stratos) und das Zellpellet 2x in 6 Vol KP-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml KP-Puffer mit 1 mg/ml NHC-LS-Biotin (Thermo Scientific) resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 2-fachem Waschen der Zellen in 6 Vol TM-Puffer folgten weitere Waschschrte in 1x 6 Vol KP-Puffer und 2x 6 Vol H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>. Die Zellen wurden hiernach in 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> mit 1 µl ExtrAvidin-TRITC (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Nach Waschung des Zellpellets in 2x 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> wurde dieses in 5 ml YEPS<sub>L</sub> resuspendiert und die Zellen für 2 – 4 h unter Schütteln bei 28°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet (3.500 Upm, 5min; Heraeus Biofuge Stratos) und das Pellet nach Aufnahme in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> für die Mikroskopie vorbereitet (vgl. Kapitel 4.8).

50 mM KP-Puffer	Lösung 1: 1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	Lösung 2: 1M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	Durch Mischung von Lösung 1 und 2 pH 8,0 einstellen;
	anschließend mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 50 mM verdünnen
TM-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,5
	50 mM MgCl <sub>2</sub>
	in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>

### 4.7.4 In situ Immunofluoreszenz

Für die *in situ* Immunfluoreszenzmikroskopie von *U. maydis* wurde nach Protokoll von Banuett und Herskowitz (2002) vorgegangen, allerdings mit leichten Abwandlungen. Zunächst wurde die Bildung von adhäsiven Filamenten und Appressorien wie in Kapitel 4.4.2 beschrieben induziert. Zur Fixierung der Zellen wurden die Objektträger für 30 min in 3% Formaldehyd (in PBS, pH7,4) inkubiert. Nach einem Waschschrte mit PBS-Puffer wurden die Objektträger in Blockierlösung (5% BSA in PBS, pH 7,4) überführt und für 1 h schwenkend inkubiert. Die Blockierlösung wurde durch Antikörperlösung ersetzt. Diese

enthielt primären anti-HA Antikörper aus Maus (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) in einer 1:1500 Verdünnung in Blockierlösung. Nach einer 1-stündigen Inkubation wurden die Objektträger dreimal für 10 min mit PBS gewaschen und anschließend mit Antikörperlösung, welche den sekundären AF488-konjugierten Antikörper (Invitrogen, Karlsruhe) in einer Verdünnung von 1:1500 (in Blockierlösung) enthielt, für 1 h bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS, wurden die Filamente durch konfokale Mikroskopie analysiert.

#### 4.8 Mikroskopie und Bildverarbeitung

Für die Mikroskopie von Zellen aus axenischer Kultur wurden Kulturen verwendet, die bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 - 0,8 gewachsen waren. Vor der Mikroskopie wurden die Objektträger mit einem Agarosekissen (2% Agarose) versehen, auf das anschließend die Zellsuspension aufgetragen wurde. Dies führte dazu, dass die Zellen in ihrer Position fixiert wurden, was die Mikroskopie erleichterte.

Für die Mikroskopie wurde ein Axioplan II microscope (Zeiss) mit differenzieller Interferenz Optik verwendet. Für DIC (*differential interference contrast*)-Mikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie wurden ein 40-, 63- und 100-faches Plan-Apochromat Objektiv (Zeiss) mit 1,4 numerischer Aperatur verwendet. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden diverse Filtersets verwendet, welche von Semrock (New York/USA) bezogen wurden. Digitale Aufnahmen wurden mit einer HQ charge-couple device camera (Photometrics, Göttingen) durchgeführt und die Aufnahmen mit dem Programm MetaMorph (Version 6.2r6) bearbeitet.

Für die konfokale Laser Scanning Mikroskopie wurde ein TCS-SP5 (Leica, Bensheim) verwendet. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen sowie die verwendeten Laser für die verschiedenen Anwendungen sind in Tab. 8 dargestellt. Die Bildbearbeitung erfolgte mit der zugehörigen LEICA Software LAS AF (Leica application suite). Dabei wurden die zweidimensional abgerasterten Ebenen in einer Maximumprojektion übereinander gelegt.

**Tab. 8: Verwendete Laser und detektierte Emissionswellenlängen bei der konfokalen Mikroskopie**

Laser	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge	Detektion
Argon Laser	488	495 - 530 nm	GFP
Argon Laser	488	500 - 540 nm	AF488

DPSS Laser	561	580 - 660 nm	mCherry, PI
405 Diode	405	415 - 460 nm	CW, Autofluoreszenz

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in Kooperation mit Dr. A. Klingl (Philipps-Universität Marburg/Synmikro) durchgeführt. Für die Probenpräparation wurden *U. maydis* Sporidien in YEPS<sub>L</sub> zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 – 0,8 kultiviert und in Wasser zu einer OD<sub>600</sub> von 1,5 aufgenommen. Zur Darstellung zellulärer (Ultra)-Strukturen wurden die Proben in einer Hochdruckgefrieranlage (HPF Compact 02, Wohlwend Engineering, Sennwald, Schweiz) mit flüssigem Stickstoff und einem Druck von etwa 2100 bar kryofixiert. An einer Hochvakuum-Bedampfungs- und Gefrierätzanlage (CFE 50; Cressington Ltd., Watford, UK) wurde zusätzlich eine Gefrierbruch/Gefrierätzung mit anschließender Eponeinbettung für Ultradünnschnitte gemäß Klingl *et al.* (2011) und Rachel *et al.* (2010) vorgenommen. Leichte Abwandlungen gab es hierbei lediglich in der Zusammensetzung der Substitutionslösung A.O.U.H. (90,7% Aceton mit 0,2% OsO<sub>4</sub>, 0,1% Uranylacetat; in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>), welche die Kontrastierung der zellulären Strukturen bewirkt. Die Untersuchung der fertigen Präparate erfolgte an einem JEOL JEM 2100 Transmissionselektronenmikroskop (Tokyo, Japan), welches mit einer 2k x 2k CCD-Kamera F214 in Kombination mit der EM-Menu 4 Software (TVIPS, Gauting) ausgestattet ist. Über ein Messtool dieser Software war es zudem möglich, die Dicke der Zellwand sowie die Größe von Zellbestandteilen zu ermitteln.

Für die Immunmarkierung wurde der aus Kaninchen gewonnene primäre, polyklonale Antikörper Anti-Um11464 (vgl. Kapitel 4.6.6.5) in der Verdünnung 1:10.000, der sekundäre Antikörper Anti-Kaninchen 1:20 eingesetzt.

## 4.9 Transkriptom-Analysen mittels RNASeq

### 4.9.1 RNA-Präparation

Die RNA-Präparation für Transkriptomanalysen wurde von der technischen Assistentin K. Münch vorgenommen. Dabei wurden sieben Tage alte Maispflanzen der Sorte Early Golden Bantam per Spritzinfektion mit den *U. maydis* Stämmen SG200 und SG200Δum11464 sowie mit Wasser als Kontrolle infiziert (vgl Kapitel 4.4.4), wobei je Bedingung drei unabhängige Experimente durchgeführt wurden. Die Pflanzen wurden in

einem Gewächshaus bei 28°C (Tag) bzw. 20°C (Nacht) und einer relativen Luftfeuchte von 40% (Tag) bzw. 60% (Nacht) kultiviert. 12 Stunden nach Infektion wurden die Blätter von zehn Pflanzen wie in Kapitel 4.5.1.3 beschrieben geerntet, in flüssigen Stickstoff gefroren und zur RNA-Isolation verwendet (vgl. Kapitel 4.5.1.4). 50 µg Gesamt-RNA wurden mittels des „Qiagen RNeasy Mini Kits“ nach Herstellerangaben aufgereinigt und einer Qualitätskontrolle unter Verwendung des „Agilent RNA 6000 Nano Kits“ unterzogen. Die Qualität der RNA wurde mittels Kapillar-Gelelektrophorese auf einem „Agilent 2100-Bioanalyzer“ überprüft.

#### 4.9.2 „Library“-Konstruktion

Die qualitätsgeprüfte RNA wurde anschließend am Max Planck Genome Centre in Köln weiterbearbeitet. Hierbei wurde in einem ersten Schritt die Gesamt-RNA einer rRNA-Abreicherung unterzogen, wobei eine Mischung aus 50% „RiboMinus™ Eukaryote Kit for RNA-Seq“ und 50% „RiboMinus™ Plant Kit for RNA-Seq“ (beides Invitrogen, Karlsruhe) zum Zuge kam. Die resultierende RNA wurden daraufhin gemäß des „Illumina Std. TruSeq Protokolls“ unter Anwesenheit zweiwertiger Ionen fragmentiert und revers transkribiert, wobei die entstandene Erststrang cDNA als Matrize für die Zweitstrangsynthese diente. Die cDNA-Fragmente wurden anschließend von 3'- bzw. 5'-Überhängen befreit und am 3'-Ende mit einem „A“-Überhang versehen, der im Folgenden der Ligation der „Library“-spezifischen Adaptoren diente. Nach abermaliger Aufreinigung und PCR-Amplifikation der Ligationsprodukte wurden diese für die Illumina-Sequenzierung (HiSeq2000) eingesetzt.

#### 4.9.3 Datenanalyse

Hierfür wurden zunächst die aus Köln erhaltenen Transkriptomsequenzen („reads“) unter Verwendung des Programmes CLC Genomics Workbench 5 (CLC bio) gegen das veröffentlichte Mais-Referenz-Genom (Schnable *et al.*, 2009) (ZmB73\_5b\_FGS\_genes.fastg.gz; Maize Genome Sequence Project, <http://ftp.maizesequence.org/current/filtered-set/>) abgeglichen („mapping“), wobei 75% der „reads“ spezifischen Maisgenen zugeordnet werden konnten. Für die vergleichende Transkriptomanalyse wurden im Anschluss unter Berücksichtigung der drei biologischen Replikate die differenziell regulierten Gene mittels des Statistikprogrammes R unter

Verwendung der Bioconductor Software *edgeR* identifiziert, wobei zwischen hoch- und herunterregulierten Genen differenziert wurde. Differenziell regulierte Gene wurden hierbei als signifikant betrachtet, wenn ihr „bereinigter“ p-Wert („*adj. P-value*“) unter 20% lag und die Irrtumswahrscheinlichkeit (FDR, „*false discovery rate*“)  $< 0,05$  war. Die graphische Veranschaulichung der Daten erfolgte mittels der R Pakete „*limma*“ und „*gplots*“. Mengendiagramme („*venn diagrams*“) wurden hierbei unter Verwendung der Funktion „*get.venn*“, Hitzekarten („*Heatmaps*“) unter Verwendung der Funktion „*heatmap.2*“ und basierend auf Mortazavi *et al.*, 2008 erstellt.

#### 4.10 Bioinformatische Analysen

Aminosäure- und Nukleotidsequenzen wurden aus den Datenbanken GenBank, dem „National Center of Biotechnology Information“ (NCBI; [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) und MIPS *Ustilago maydis* Database (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago/>) entnommen. Die von diesen Webseiten zur Verfügung gestellten BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) -Funktionen wurden zur Identifizierung von ähnlichen Protein- und Nukleotidsequenzen verwendet. Die virtuelle Klonierung von Plasmiden und die virtuelle Erstellung von Oligonukleotidsequenzen wurden mit dem Programm „Clone Manager Professional 9“ durchgeführt. Dieses Programm enthält zudem eine ClustalW Funktion, womit Aminosäuresequenzen gegeneinander abgeglichen und die jeweilige Aminosäureidentität bestimmt werden kann. Domänenanalysen wurden mit dem Programm SMART (Simple Modular Architecture Research Tool, <http://smart.embl-heidelberg.de/>) durchgeführt. Zur Vorhersage von Signalpeptiden in Proteinsequenzen dienten die Programme SignalP 4.0 (<http://cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) und TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>). Der „ExPASy Molecular Biology Server“ (<http://expasy.org>) bietet vielfältige Programme zur detaillierteren Charakterisierung von Protein-Domänenstrukturen. Zur Vorhersage von putativen O- und N-Glycosylierungsstellen in Aminosäuresequenzen wurden u.a. die Programme NetOGlyc (<http://cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) und NetNGlyc (<http://cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) verwendet. Putative GPI-Anker in der Proteinsequenz wurden mithilfe der Programme Big PI-Predictor ([http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html); Eisenhaber *et al.*, 2004) und PredGPI (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/predgpi/pred.htm>) bestimmt.



## 5 Literatur

**Aichinger C., Hansson K., Eichhorn H., Lessing F., Mannhaupt G., Mewes W. und Kahmann R.** (2003) Identification of plant-regulated genes in *Ustilago maydis* by enhancer-trapping mutagenesis. *Molecular Genetics and Genomics* **270**: 303-314

**Anders S. und Huber W.** (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology* **11**: R106

**Andre G., Leenhouts K., Hols P. und Dufrene Y.F.** (2008) Detection and localization of single LysM-peptidoglycan interactions. *Journal of bacteriology* **190**: 7079-7086

**Apoga D., Barnard J., Craighead H.G. und Hoch H.C.** (2004) Quantification of substratum contact required for initiation of *Colletotrichum graminicola* appressoria. *Fungal genetics and biology : FG & B* **41**: 1-12

**Ausubel F.M.** (2005) Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature immunology* **6**: 973-979

**Ausubel F.M., Brenz R., Kongston R.E., Moore D.D., Seidmann J.G., Smith J.A. und Strukl K.** (1987) Current protocols in molecular microbiology. *John Wiley & Sons, Inc, USA*

**Banuett F. und Herskowitz I.** (1989) Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 5878-5882

**Banuett F. und Herskowitz I.** (1996) Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**: 2965-2976

**Banuett F. und Herskowitz I.** (2002) Bud morphogenesis and the actin and microtubule cytoskeletons during budding in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology* **37**: 149-170

**Bari R. und Jones J.D.** (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant molecular biology* **69**: 473-488

**Bateman A. und Bycroft M.** (2000) The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD). *J Mol Biol* **299**: 1113-1119

**Bell A.A. und Wheeler M.H.** (1986) Biosynthesis and Functions of Fungal Melanins. *Annual review of phytopathology* **24**: 411-451

**Bernard M., Mouyna I., Dubreucq G., Debeaupuis J.P., Fontaine T., Vorgias C., Fuglsang C. und Latge J.P.** (2002) Characterization of a cell-wall acid phosphatase (PhoAp) in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **148**: 2819-2829

- Bevan M.** (1984) Binary Agrobacterium Vectors for Plant Transformation. *Nucleic Acids Research* **12**: 8711-8721
- Bielnicki J., Devedjiev Y., Derewenda U., Dauter Z., Joachimiak A. und Derewenda Z.S.** (2006) *B. subtilis* ykuD protein at 2.0 Å resolution: insights into the structure and function of a novel, ubiquitous family of bacterial enzymes. *Proteins* **62**: 144-151
- Böhmer C., Böhmer M., Bölker M. und Sandrock B.** (2008) Cdc42 and the Ste20-like kinase Don3 act independently in triggering cytokinesis in *Ustilago maydis*. *J Cell Sci* **121**: 143-148
- Bölker M., Genin S., Lehmle C. und Kahmann R.** (1995) Genetic-regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Canadian Journal of Botany* **73**: S320-S325
- Bölker M., Urban M. und Kahmann R.** (1992) The a mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**: 441-450
- Bolton M.D., van Esse H.P., Vossen J.H., de Jonge R., Stergiopoulos I., Stulemeijer I.J., van den Berg G.C., Borrás-Hidalgo O., Dekker H.L., de Koster C.G., de Wit P.J., Joosten M.H. und Thomma B.P.** (2008) The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. *Mol Microbiol* **69**: 119-136
- Borges F., Layec S., Fernandez A., Decaris B. und Leblond-Bourget N.** (2006) High genetic variability of the *Streptococcus thermophilus* cse central part, a repeat rich region required for full cell segregation activity. *Antonie van Leeuwenhoek* **90**: 245-255
- Bowman S.M. und Free S.J.** (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **28**: 799-808
- Brachmann A.** (2001) Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bE/bW-Heterodimer. *Dissertation*: Ludwig-Maximilian-Universität, München
- Brachmann A., König J., Julius C. und Feldbrügge M.** (2004) A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **272**: 216-226
- Brachmann A., Weinzierl G., Kämper J. und Kahmann R.** (2001) Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **42**: 1047-1063
- Bradford M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Broomfield P.L. und Hargreaves J.A.** (1992) A single amino-acid change in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to carboxin in *Ustilago maydis*. *Curr Genet* **22**: 117-121

- Buist G., Karsens H., Nauta A., van Sinderen D., Venema G. und Kok J.** (1997) Autolysis of *Lactococcus lactis* caused by induced overproduction of its major autolysin, AcmA. *Applied and environmental microbiology* **63**: 2722-2728
- Buist G., Kok J., Leenhouts K.J., Dabrowska M., Venema G. und Haandrikman A.J.** (1995) Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis*, a muramidase needed for cell separation. *Journal of bacteriology* **177**: 1554-1563
- Buist G., Steen A., Kok J. und Kuipers O.P.** (2008) LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. *Mol Microbiol* **68**: 838-847
- Callow J.A.** (1975) Endopolyploidy in maize smut neoplasms induced by the maize smut fungus, *Ustilago maydis*. *New Phytol* **75**: 253-257
- Catanzariti A.M., Dodds P.N., Lawrence G.J., Ayliffe M.A. und Ellis J.G.** (2006) Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *Plant Cell* **18**: 243-256
- Celerin M. und Day A.W.** (1998) Sex, smut, and RNA: The complexity of fungal fimbriae. *Int J Plant Sci* **159**: 175-184
- Chang Y.C. und Kwon-Chung K.J.** (1994) Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol Cell Biol* **14**: 4912-4919
- Cheong Y.H., Chang H.S., Gupta R., Wang X., Zhu T. und Luan S.** (2002) Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in Arabidopsis. *Plant physiology* **129**: 661-677
- Chisholm S.T., Coaker G., Day B. und Staskawicz B.J.** (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**: 803-814
- Christensen J.J.** (1963) Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer Phytopathol Soc Monogr* **2**
- Cohen S.N., Chang A.C. und Hsu L.** (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**: 2110-2114
- da Cunha L., McFall A.J. und Mackey D.** (2006) Innate immunity in plants: a continuum of layered defenses. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **8**: 1372-1381
- de Jonge R. und Thomma B.P.** (2009) Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends Microbiol* **17**: 151-157
- de Jonge R., van Esse H.P., Kombrink A., Shinya T., Desaki Y., Bours R., van der Krol S., Shibuya N., Joosten M.H. und Thomma B.P.** (2010) Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science* **329**: 953-955

**de Wit P.J.G.M.** (2007) Visions & reflections (minireview) - How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell Mol Life Sci* **64**: 2726-2732

**Di Stasio M., Brefort T., Mendoza-Mendoza A., Munch K. und Kahmann R.** (2009) The dual specificity phosphatase Rok1 negatively regulates mating and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **73**: 73-88

**Djamei A., Schipper K., Rabe F., Ghosh A., Vincon V., Kahnt J., Osorio S., Tohge T., Fernie A.R., Feussner I., Feussner K., Meinicke P., Stierhof Y.D., Schwarz H., Macek B., Mann M. und Kahmann R.** (2011) Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* **478**: 395-398

**Doehlemann G., Berndt P. und Hahn M.** (2006) Different signalling pathways involving a Galpha protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia. *Mol Microbiol* **59**: 821-835

**Doehlemann G., Reissmann S., Assmann D., Fleckenstein M. und Kahmann R.** (2011) Two linked genes encoding a secreted effector and a membrane protein are essential for *Ustilago maydis*-induced tumour formation. *Mol Microbiol* **81**: 751-766

**Doehlemann G., van der Linde K., Assmann D., Schwammbach D., Hof A., Mohanty A., Jackson D. und Kahmann R.** (2009) Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS pathogens* **5**: e1000290

**Doehlemann G., Wahl R., Horst R.J., Voll L.M., Usadel B., Poree F., Stitt M., Pons-Kuhnemann J., Sonnewald U., Kahmann R. und Kamper J.** (2008) Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **56**: 181-195

**Doering T.L.** (2009) How Sweet it is! Cell Wall Biogenesis and Polysaccharide Capsule Formation in *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Microbiol* **63**: 223-247

**Eisenhaber B., Schneider G., Wildpaner M. und Eisenhaber F.** (2004) A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J Mol Biol* **337**: 243-253

**Finkel-Jimenez B., Wuthrich M. und Klein B.S.** (2002) BAD1, an essential virulence factor of *Blastomyces dermatitidis*, suppresses host TNF-alpha production through TGF-beta-dependent and -independent mechanisms. *Journal of Immunology* **168**: 5746-5755

**Fliegmann J., Uhlenbroich S., Shinya T., Martinez Y., Lefebvre B., Shibuya N. und Bono J.J.** (2011) Biochemical and phylogenetic analysis of CEBiP-like LysM domain-containing extracellular proteins in higher plants. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* **49**: 709-720

**Foreman-Wykert A.K. und Miller J.F.** (2003) Hypervirulence and pathogen fitness. *Trends Microbiol* **11**: 105-108

- Freitag J., Lanver D., Bohmer C., Schink K.O., Bolker M. und Sandrock B.** (2011) Septation of infectious hyphae is critical for appressoria formation and virulence in the smut fungus *Ustilago maydis*. *PLoS pathogens* **7**: e1002044
- Gardiner R., Podgorski C. und Day A.W.** (1982) Serological Studies on the Fimbriae of Yeasts and Yeastlike Species. *Bot Gaz* **143**: 534-541
- Garvey K.J., Saedi M.S. und Ito J.** (1986) Nucleotide sequence of *Bacillus* phage phi 29 genes 14 and 15: homology of gene 15 with other phage lysozymes. *Nucleic Acids Res* **14**: 10001-10008
- Gilbert N.M., Baker L.G., Specht C.A. und Lodge J.K.** (2012) A glycosylphosphatidylinositol anchor is required for membrane localization but dispensable for cell wall association of chitin deacetylase 2 in *Cryptococcus neoformans*. *MBio* **3**
- Gillissen B., Bergemann J., Sandmann C., Schroeer B., Bölker M. und Kahmann R.** (1992) A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**: 647-657
- Glazebrook J.** (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual review of phytopathology* **43**: 205-227
- Gruber S., Vaaje-Kolstad G., Matarese F., Lopez-Mondejar R., Kubicek C.P. und Seidl-Seiboth V.** (2011) Analysis of subgroup C of fungal chitinases containing chitin-binding and LysM modules in the mycoparasite *Trichoderma atroviride*. *Glycobiology* **21**: 122-133
- Heiler S., Mendgen K. und Deising H.** (1993) Cellulolytic Enzymes of the Obligately Biotrophic Rust Fungus *Uromyces Viciae-Fabae* Are Regulated Differentiation-Specifically. *Mycol Res* **97**: 77-85
- Hemetsberger C., Herrberger C., Zechmann B., Hillmer M. und Doehlemann G.** (2012) The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. *PLoS pathogens* **8**: e1002684
- Hoffman C.S. und Winston F.** (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. *Gene* **57**: 267-272
- Holliday R.** (1961) The genetics of *Ustilago maydis*. *Genet Res Camb* **2**: 204-230
- Holliday R.** (1974) *Ustilago maydis*. In *Handbook of Genetics*, edited by R C King New York:Plenum 575-595
- Iizasa E., Mitsutomi M. und Nagano Y.** (2010) Direct binding of a plant LysM receptor-like kinase, LysM RLK1/CERK1, to chitin *in vitro*. *J Biol Chem* **285**: 2996-3004
- Jones J.D. und Dangl J.L.** (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329
- Juarez-Montiel M., Ruiloba de Leon S., Chavez-Camarillo G., Hernandez-Rodriguez C. und Villa-Tanaca L.** (2011) Huitlacoche (corn smut), caused by the phytopathogenic

fungus *Ustilago maydis*, as a functional food. *Revista iberoamericana de micologia* **28**: 69-73

**Kajimura J., Fujiwara T., Yamada S., Suzawa Y., Nishida T., Oyamada Y., Hayashi I., Yamagishi J., Komatsuzawa H. und Sugai M.** (2005) Identification and molecular characterization of an N-acetylmuramyl-L-alanine amidase Sle1 involved in cell separation of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **58**: 1087-1101

**Kaku H., Nishizawa Y., Ishii-Minami N., Akimoto-Tomiyama C., Dohmae N., Takio K., Minami E. und Shibuya N.** (2006) Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 11086-11091

**Kämper J.** (2004) A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **271**: 103-110

**Kämper J., Kahmann R., Bölker M., Ma L.J., Brefort T., Saville B.J., Banuett F., Kronstad J.W., Gold S.E., Müller O., Perlin M.H., Wosten H.A., de Vries R., Ruiz-Herrera J., Reynaga-Pena C.G., Snetselaar K., McCann M., Perez-Martin J., Feldbrügge M., Basse C.W., Steinberg G., Ibeas J.I., Holloman W., Guzman P., Farman M., Stajich J.E., Sentandreu R., Gonzalez-Prieto J.M., Kennell J.C., Molina L., Schirawski J., Mendoza-Mendoza A., Greilinger D., Münch K., Rössel N., Scherer M., Vranes M., Ladendorf O., Vincon V., Fuchs U., Sandrock B., Meng S., Ho E.C., Cahill M.J., Boyce K.J., Klose J., Klosterman S.J., Deelstra H.J., Ortiz-Castellanos L., Li W., Sanchez-Alonso P., Schreier P.H., Hauser-Hahn I., Vaupel M., Koopmann E., Friedrich G., Voss H., Schluter T., Margolis J., Platt D., Swimmer C., Gnirke A., Chen F., Vysotskaia V., Mannhaupt G., Guldener U., Munsterkotter M., Haase D., Oesterheld M., Mewes H.W., Mauceli E.W., DeCaprio D., Wade C.M., Butler J., Young S., Jaffe D.B., Calvo S., Nusbaum C., Galagan J. und Birren B.W.** (2006) Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**: 97-101

**Kamran M., Calcagno A.M., Findon H., Bignell E., Jones M.D., Warn P., Hopkins P., Denning D.W., Butler G., Rogers T., Muhlschlegel F.A. und Haynes K.** (2004) Inactivation of transcription factor gene ACE2 in the fungal pathogen *Candida glabrata* results in hypervirulence. *Eukaryotic cell* **3**: 546-552

**Kapteyn J.C., Montijn R.C., Dijkgraaf G.J., Van den Ende H. und Klis F.M.** (1995) Covalent association of beta-1,3-glucan with beta-1,6-glucosylated mannoproteins in cell walls of *Candida albicans*. *Journal of bacteriology* **177**: 3788-3792

**Klingl A., Moissl-Eichinger C., Wanner G., Zweck J., Huber H., Thomm M. und Rachel R.** (2011) Analysis of the surface proteins of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain SP5/1 and the new, pyrite-oxidizing *Acidithiobacillus* isolate HV2/2, and their possible involvement in pyrite oxidation. *Arch Microbiol* **193**: 867-882

**Koeck M., Hardham A.R. und Dodds P.N.** (2011) The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. *Cellular microbiology* **13**: 1849-1857

- Koncz C. und Schell J.** (1986) The Promoter of TI-DNA Gene 5 Controls the Tissue-Specific Expression of Chimeric Genes Carried by a Novel Type of Agrobacterium Binary Vector. *Mol Gen Genet* **204**: 383-396
- Kraulis P.J.** (1991) Molscript - a Program to Produce Both Detailed and Schematic Plots of Protein Structures. *J Appl Crystallogr* **24**: 946-950
- Laemmli U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Latge J.P.** (2007) The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology* **66**: 279-290
- Laurie J.D., Ali S., Linning R., Mannhaupt G., Wong P., Guldener U., Munsterkotter M., Moore R., Kahmann R., Bakkeren G. und Schirawski J.** (2012) Genome comparison of barley and maize smut fungi reveals targeted loss of RNA silencing components and species-specific presence of transposable elements. *Plant Cell* **24**: 1733-1745
- Layec S., Gerard J., Legue V., Chapot-Chartier M.P., Courtin P., Borges F., Decaris B. und Leblond-Bourget N.** (2009) The CHAP domain of Cse functions as an endopeptidase that acts at mature septa to promote *Streptococcus thermophilus* cell separation. *Mol Microbiol* **71**: 1205-1217
- Lee S.J., Kelley B.S., Damasceno C.M., St John B., Kim B.S., Kim B.D. und Rose J.K.** (2006) A functional screen to characterize the secretomes of eukaryotic pathogens and their hosts in planta. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 1368-1377
- Lerouge P., Roche P., Faucher C., Maillet F., Truchet G., Prome J.C. und Denarie J.** (1990) Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **344**: 781-784
- Limpens E., Franken C., Smit P., Willemse J., Bisseling T. und Geurts R.** (2003) LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* **302**: 630-633
- Madsen E.B., Madsen L.H., Radutoiu S., Olbryt M., Rakwalska M., Szczyglowski K., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N. und Stougaard J.** (2003) A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* **425**: 637-640
- Mahlert M., Leveleki L., Hlubek A., Sandrock B. und Bölker M.** (2006) Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **59**: 567-578
- Marshall R., Kombrink A., Motteram J., Loza-Reyes E., Lucas J., Hammond-Kosack K.E., Thomma B.P. und Rudd J.J.** (2011) Analysis of two *in planta* expressed LysM effector homologs from the fungus *Mycosphaerella graminicola* reveals novel functional properties and varying contributions to virulence on wheat. *Plant physiology* **156**: 756-769

- Maubon D., Park S., Tanguy M., Huerre M., Schmitt C., Prevost M.C., Perlin D.S., Latge J.P. und Beauvais A.** (2006) AGS3, an alpha(1-3)glucan synthase gene family member of *Aspergillus fumigatus*, modulates mycelium growth in the lung of experimentally infected mice. *Fungal genetics and biology : FG & B* **43**: 366-375
- Mendoza-Mendoza A., Berndt P., Djamei A., Weise C., Linne U., Marahiel M., Vranes M., Kämper J. und Kahmann R.** (2009) Physical-chemical plant-derived signals induce differentiation in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **71**: 895-911
- Mentlak T.A., Kombrink A., Shinya T., Ryder L.S., Otomo I., Saitoh H., Terauchi R., Nishizawa Y., Shibuya N., Thomma B.P. und Talbot N.J.** (2012) Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. *Plant Cell* **24**: 322-335
- Miya A., Albert P., Shinya T., Desaki Y., Ichimura K., Shirasu K., Narusaka Y., Kawakami N., Kaku H. und Shibuya N.** (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 19613-19618
- Möll A., Schlimpert S., Briegel A., Jensen G.J. und Thanbichler M.** (2010) DipM, a new factor required for peptidoglycan remodelling during cell division in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **77**: 90-107
- Mortazavi A., Williams B.A., McCue K., Schaeffer L. und Wold B.** (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* **5**: 621-628
- Mueller A.N., Ziemann S., Treitschke S., Assmann D. und Doehlemann G.** (2013) Compatibility in the *Ustilago maydis*-Maize Interaction Requires Inhibition of Host Cysteine Proteases by the Fungal Effector Pit2. *PLoS pathogens* **9**: e1003177
- Mulder L., Lefebvre B., Cullimore J. und Imberty A.** (2006) LysM domains of *Medicago truncatula* NFP protein involved in Nod factor perception. Glycosylation state, molecular modeling and docking of chitooligosaccharides and Nod factors. *Glycobiology* **16**: 801-809
- Müller K. und Felix G.** (2012) Ligands of RLKs and RLPs Involved in Defense and Symbiosis. *Signaling and Communication in Plants* **13**: 173-194
- Müller O., Schreier P.H. und Uhrig J.F.** (2008) Identification and characterization of secreted and pathogenesis-related proteins in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **279**: 27-39
- Nobes C.D. und Hall A.** (1995) Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochemical Society transactions* **23**: 456-459
- Ohnuma T., Onaga S., Murata K., Taira T. und Katoh E.** (2008) LysM domains from *Pteris ryukyuensis* chitinase-A: a stability study and characterization of the chitin-binding site. *J Biol Chem* **283**: 5178-5187



**Onaga S. und Taira T.** (2008) A new type of plant chitinase containing LysM domains from a fern (*Pteris ryukyuensis*): roles of LysM domains in chitin binding and antifungal activity. *Glycobiology* **18**: 414-423

**Petutschnig E.K., Jones A.M., Serazetdinova L., Lipka U. und Lipka V.** (2010) The lysin motif receptor-like kinase (LysM-RLK) CERK1 is a major chitin-binding protein in *Arabidopsis thaliana* and subject to chitin-induced phosphorylation. *J Biol Chem* **285**: 28902-28911

**Plaine A., Walker L., Da Costa G., Mora-Montes H.M., McKinnon A., Gow N.A., Gaillardin C., Munro C.A. und Richard M.L.** (2008) Functional analysis of *Candida albicans* GPI-anchored proteins: roles in cell wall integrity and caspofungin sensitivity. *Fungal genetics and biology : FG & B* **45**: 1404-1414

**Rachel R., Meyer C., Klingl A., Gurster S., Heimerl T., Wasserburger N., Burghardt T., Kuper U., Bellack A., Schopf S., Wirth R., Huber H. und Wanner G.** (2010) Analysis of the ultrastructure of archaea by electron microscopy. *Methods Cell Biol* **96**: 47-69

**Radutoiu S., Madsen L.H., Madsen E.B., Felle H.H., Umehara Y., Gronlund M., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., Sandal N. und Stougaard J.** (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* **425**: 585-592

**Rappleye C.A., Engle J.T. und Goldman W.E.** (2004) RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for alpha-(1,3)-glucan in virulence. *Molecular Microbiology* **53**: 153-165

**Reese A.J., Yoneda A., Breger J.A., Beauvais A., Liu H., Griffith C.L., Bose I., Kim M.J., Skau C., Yang S., Sefko J.A., Osumi M., Latge J.P., Mylonakis E. und Doering T.L.** (2007) Loss of cell wall alpha(1-3) glucan affects *Cryptococcus neoformans* from ultrastructure to virulence. *Molecular Microbiology* **63**: 1385-1398

**Rghei N.A.** (1991) Involvement of Fimbriae In Host-Mycoparasite recognition. *Dissertation*: Brock University St. Catharines, Ontario

**Rowell J.B.** (1955) Functional role of compatibility factors and an in vitro test for sexual incompatibility with haploid lines of *Ustilago zea*. *Phytopathology* **45**: 370-374

**Rowell J.B. und DeVay J.E.** (1954) Genetics of *Ustilago zea* in relation to basic problems of its pathogenicity. *Phytopathology* **44**: 356-362

**Ruiz-Herrera J. und Martinez-Espinoza A.D.** (1998) The fungus *Ustilago maydis*, from the aztec cuisine to the research laboratory. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* **1**: 149-158

**Ruiz-Herrera J., Ortiz-Castellanos L., Martinez A.I., Leon-Ramirez C. und Sentandreu R.** (2008) Analysis of the proteins involved in the structure and synthesis of the cell wall of *Ustilago maydis*. *Fungal genetics and biology : FG & B* **45 Suppl 1**: S71-76

**Sambrook J., Frisch E.F. und Maniatis T.** (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbour*

**Schirawski J., Mannhaupt G., Münch K., Brefort T., Schipper K., Doehlemann G., Di Stasio M., Rössel N., Mendoza-Mendoza A., Pester D., Müller O., Winterberg B., Meyer E., Ghareeb H., Wollenberg T., Munsterkotter M., Wong P., Walter M., Stukenbrock E., Guldener U. und Kahmann R.** (2010) Pathogenicity determinants in smut fungi revealed by genome comparison. *Science* **330**: 1546-1548

**Schnable P.S., Ware D., Fulton R.S., Stein J.C., Wei F., Pasternak S., Liang C., Zhang J., Fulton L., Graves T.A., Minx P., Reily A.D., Courtney L., Kruchowski S.S., Tomlinson C., Strong C., Delehaunty K., Fronick C., Courtney B., Rock S.M., Belter E., Du F., Kim K., Abbott R.M., Cotton M., Levy A., Marchetto P., Ochoa K., Jackson S.M., Gillam B., Chen W., Yan L., Higginbotham J., Cardenas M., Waligorski J., Applebaum E., Phelps L., Falcone J., Kanchi K., Thane T., Scimone A., Thane N., Henke J., Wang T., Ruppert J., Shah N., Rotter K., Hodges J., Ingenthron E., Cordes M., Kohlberg S., Sgro J., Delgado B., Mead K., Chinwalla A., Leonard S., Crouse K., Collura K., Kudrna D., Currie J., He R., Angelova A., Rajasekar S., Mueller T., Lomeli R., Scara G., Ko A., Delaney K., Wissotski M., Lopez G., Campos D., Braidotti M., Ashley E., Golser W., Kim H., Lee S., Lin J., Dujmic Z., Kim W., Talag J., Zuccolo A., Fan C., Sebastian A., Kramer M., Spiegel L., Nascimento L., Zutavern T., Miller B., Ambroise C., Muller S., Spooner W., Narechania A., Ren L., Wei S., Kumari S., Faga B., Levy M.J., McMahan L., Van Buren P., Vaughn M.W., Ying K., Yeh C.T., Emrich S.J., Jia Y., Kalyanaraman A., Hsia A.P., Barbazuk W.B., Baucom R.S., Brutnell T.P., Carpita N.C., Chaparro C., Chia J.M., Deragon J.M., Estill J.C., Fu Y., Jeddelloh J.A., Han Y., Lee H., Li P., Lisch D.R., Liu S., Liu Z., Nagel D.H., McCann M.C., SanMiguel P., Myers A.M., Nettleton D., Nguyen J., Penning B.W., Ponnala L., Schneider K.L., Schwartz D.C., Sharma A., Soderlund C., Springer N.M., Sun Q., Wang H., Waterman M., Westerman R., Wolfgruber T.K., Yang L., Yu Y., Zhang L., Zhou S., Zhu Q., Bennetzen J.L., Dawe R.K., Jiang J., Jiang N., Presting G.G., Wessler S.R., Aluru S., Martienssen R.A., Clifton S.W., McCombie W.R., Wing R.A. und Wilson R.K.** (2009) The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* **326**: 1112-1115

**Schulz B., Banuett F., Dahl M., Schlesinger R., Schafer W., Martin T., Herskowitz I. und Kahmann R.** (1990) The B-Alleles of *U. maydis*, Whose Combinations Program Pathogenic Development, Code for Polypeptides Containing a Homeodomain-Related Motif. *Cell* **60**: 295-306

**Shimizu T., Nakano T., Takamizawa D., Desaki Y., Ishii-Minami N., Nishizawa Y., Minami E., Okada K., Yamane H., Kaku H. und Shibuya N.** (2010) Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **64**: 204-214

**Snetselaar K.M. und Mims C.W.** (1992) Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* **84**: 193-203

**Southern E.M.** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517

- Stark M.J. und Boyd A.** (1986) The killer toxin of *Kluyveromyces lactis*: characterization of the toxin subunits and identification of the genes which encode them. *The EMBO journal* **5**: 1995-2002
- Steen A., Buist G., Horsburgh G.J., Venema G., Kuipers O.P., Foster S.J. und Kok J.** (2005) AcmA of *Lactococcus lactis* is an N-acetylglucosaminidase with an optimal number of LysM domains for proper functioning. *The FEBS journal* **272**: 2854-2868
- Steen A., Buist G., Leenhouts K.J., El Khattabi M., Grijpstra F., Zomer A.L., Venema G., Kuipers O.P. und Kok J.** (2003) Cell wall attachment of a widely distributed peptidoglycan binding domain is hindered by cell wall constituents. *J Biol Chem* **278**: 23874-23881
- Tanaka S., Ichikawa A., Yamada K., Tsuji G., Nishiuchi T., Mori M., Koga H., Nishizawa Y., O'Connell R. und Kubo Y.** (2010) HvCEBiP, a gene homologous to rice chitin receptor CEBiP, contributes to basal resistance of barley to *Magnaporthe oryzae*. *BMC plant biology* **10**: 288
- Tarazona S., Garcia-Alcalde F., Dopazo J., Ferrer A. und Conesa A.** (2011) Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome research* **21**: 2213-2223
- ten Bokum A.M., Movahedzadeh F., Frita R., Bancroft G.J. und Stoker N.G.** (2008) The case for hypervirulence through gene deletion in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* **16**: 436-441
- Trapnell C., Hendrickson D.G., Sauvageau M., Goff L., Rinn J.L. und Pachter L.** (2012) Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nature biotechnology* **31**: 46-53
- Tsukuda T., Carleton S., Fotheringham S. und Holloman W.K.** (1988) Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol* **8**: 3703-3709
- Tucker S.L. und Talbot N.J.** (2001) Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annual review of phytopathology* **39**: 385-417
- van den Burg H.A., Harrison S.J., Joosten M.H., Vervoort J. und de Wit P.J.** (2006) *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 1420-1430
- van Esse H.P., Bolton M.D., Stergiopoulos I., de Wit P.J. und Thomma B.P.** (2007) The chitin-binding *Cladosporium fulvum* effector protein Avr4 is a virulence factor. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 1092-1101
- Wan J., Zhang X.C., Neece D., Ramonell K.M., Clough S., Kim S.Y., Stacey M.G. und Stacey G.** (2008) A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 471-481

- Weinzierl G., Leveleki L., Hassel A., Kost G., Wanner G. und Bölker M.** (2002) Regulation of cell separation in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **45**: 219-231
- Wessels J.G.H.** (1994) Developmental Regulation of Fungal Cell-Wall Formation. *Annual review of phytopathology* **32**: 413-437
- Wessels J.G.H.** (1996) Fungal hydrophobins: Proteins that function at an interface. *Trends Plant Sci* **1**: 9-15
- Xu J.H. und Day A.W.** (1992) Multiple Forms of Fimbriae on the Sporidia of Corn Smut, *Ustilago maydis*. *Int J Plant Sci* **153**: 531-540
- Yee A.R. und Kronstad J.W.** (1993) Construction of chimeric alleles with altered specificity at the b incompatibility locus of *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 664-668
- Yu L., Lee K.K., Ens K., Doig P.C., Carpenter M.R., Staddon W., Hodges R.S., Paranchych W. und Irvin R.T.** (1994) Partial Characterization of a *Candida Albicans* Fimbrial Adhesin. *Infect Immun* **62**: 2834-2842
- Zhang X.C., Cannon S.B. und Stacey G.** (2009) Evolutionary genomics of LysM genes in land plants. *BMC evolutionary biology* **9**: 183
- Zhang X.C., Wu X., Findley S., Wan J., Libault M., Nguyen H.T., Cannon S.B. und Stacey G.** (2007) Molecular evolution of lysin motif-type receptor-like kinases in plants. *Plant physiology* **144**: 623-636
- Zipfel C.** (2008) Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current opinion in immunology* **20**: 10-16

## 6 Anhang

CD mit folgenden Daten:

1. Mapping der reads gegen Maisgenom ZmB73\_5b\_FGS\_genes
2. Merging der Maisgene
3. Skripte für statistische Analyse in R

# **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Regine Kahmann für die Auswahl und Bereitstellung dieses spannenden Themas sowie die Möglichkeit, diese Arbeit in der Abteilung Organismische Interaktionen anfertigen zu dürfen, bedanken.

Des Weiteren möchte ich den Mitgliedern meiner Prüfungskommission Herrn Prof. Bölker, Herrn Prof. Thanbichler und Herrn Prof. Maier danken. Herrn Bölker danke ich zudem für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ebenfalls herzlich bedanken möchte ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Graduiertenkolleg 1216 für die Finanzierung dieser Arbeit. In diesem Zusammenhang seien besonders die Mitglieder meines GRK1216 „Thesis Advisory Committee“ Herr Prof. Bölker, Herr Prof. Thanbichler und Herr Dr. Zauner erwähnt. Ihre hilfreichen Anregungen haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Für eine gelungene Kooperation bezüglich der Immunmarkierung und Elektronenmikroskopie bedanke ich mich zudem bei Dr. Andreas Klingl. Ein Dankeschön an dieser Stelle auch an Prof. Bart Thomma und Dr. Anja Kombrink (Abteilung Phytopathology der Universität Wageningen) für den regen Informationsaustausch und viele hilfreiche, methodische Tipps hinsichtlich der Polysaccharid-Bindeversuche.

Des Weiteren bedanke ich mich bei all meinen Kollegen der AG Kahmann und AG Döhlemann für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen Diskussionen, die meine Arbeit positiv beeinflusst haben. Für ihre Unterstützung und Zusprache in manchmal aussichtslosen Momenten bedanke ich mich besonders bei Nina Neidig, Franziska Rabe, Marie Tollot und Alexander Hof, die für mich neben Arbeitskollegen vor allem zu guten Freunden geworden sind und auch fernab vom Labor immer für einen Spaß zu haben waren.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meiner Familie und all meinen Freunden in der Heimat für ihre Unterstützung und ihr Verständnis. Der größte Dank gilt dabei meinem lieben Mann Andreas für seine unermessliche Liebe, sein Vertrauen und seine uneingeschränkte Geduld während all der Höhen und Tiefen der letzten vier Jahre.

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

Nancy Stolle, geb. Groß

Geboren am 06. Mai 1986 in Zwickau

## Schulischer und akademischer Werdegang

- |           |  |
|-----------|--|
| 1992-1996 | Grundschule Trünzig  |
| 1996-1998 | Mittelschule Leubnitz  |
| 1998-2004 | Alexander von Humboldt Gymnasium Werdau<br><i>Allgemeine Hochschulreife („sehr gut“)</i> <ul style="list-style-type: none"><li>• Hauptfächer: Deutsch und Biologie</li></ul>   |
| 2004-2009 | Universität Bayreuth<br><i>Diplom-Biologin, Spezialisierung in Molekular- und Zellbiologie („sehr gut“)</i> <ul style="list-style-type: none"><li>• Titel der Diplomarbeit „Untersuchungen zu saisonalen Änderungen in der Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften im Bodenprofil eines Fichtenforstes“</li><li>• Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Gerhard Rambold und Dr. Derek Perŕoh</li></ul> |
| 2009-2013 | Philipps-Universität Marburg/Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie Marburg<br><i>Dissertation am Fachbereich Genetik</i> <ul style="list-style-type: none"><li>• Titel der Dissertation: „Funktionelle Charakterisierung eines LysM-Proteins von <i>Ustilago maydis</i>“</li><li>• Betreuung durch Frau Prof. Dr. Regine Kahmann</li></ul>   |